

Ein Myokardinfarkt führt zur kardialen Insulinresistenz und eine Beeinträchtigung der Fettsäureoxidation sowie der mitochondrialen Genexpression bei Ratten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Paulo Artur de Araujo Amorim

geboren am 10.09.1983 in Rio de Janeiro, Brasilien

Gutachter

1. Univ.-Prof. Dr. med. Torsten Doerst, Jena
2. PD Dr. med. Marcus Franz, Jena
3. PD Dr. med. Bernd Niemann, Gießen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.07.2015

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CPT-1 – Carnitine palmitoyltransferase 1

DM – Diabetes mellitus

EF – Ejektionsfraktion

FADH₂ – Flavin-Adenin-Dinukleotid in reduzierter Form

FAT/CD36 – Fatty acid translocase

GTP – Guanosintriphosphat

HI – Herzinsuffizienz

IR – Insulinresistenz

IRS-1 – Insulin-Rezeptor-Substrat-1

LCA – Linke Koronararterie

LCAD – langkettige acyl-CoA dehydrogenase

LCFA – langkettige Fettsäuren

NADH – Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid in reduzierter Form

NRF – Nuclear respiratory factor

PGC-1 α – Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α

PI3K – Phosphatidylinositol 3-kinase

PPAR – Peroxisome proliferator-activated receptor

p38MAPK – p38 mitogen activated protein kinase

TFAM – Mitochondrial transcription factor A

INHALTSVERZEICHNIS

1. Zusammenfassung	6
2. Einleitung	9
2.1 Ischämische Kardiomyopathie	10
2.2 Grundlagen des Myokardstoffwechsels	11
2.2.1 Die Regulation der Glukoseverwertung	12
2.2.2 Die Regulation des Fettsäurestoffwechsels	12
2.3 Mitochondriale Biogenese	14
2.4 Insulinwirkung am Herzen	16
2.5 Insulinresistenz und Herzinsuffizienz	18
3. Ziel der Arbeit	19
4. Publierte Originalarbeit	20
<p>Myocardial infarction in rats causes partial impairment in insulin response associated with reduced fatty acid oxidation and mitochondrial gene expression. Amorim PA*, Nguyen TD*, Shingu Y, Schwarzer M, Mohr FW, Schrepper A, Doenst T. J Thorac Cardiovasc Surg. 2010 Nov; 140(5):1160-7. (*geteilte Erstautorenschaft)</p>	
5. Diskussion	28
6. Schlussfolgerungen	33
7. Literatur- und Quellenverzeichnis	35
8. Anhang	45

8.1 Ehrenwörtliche Erklärung	45
8.2 Danksagung	46
8.3 Lebenslauf	47
8.4 Wissenschaftliche Publikationen	48

1 ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund und Ziele der Studie:

Die ischämische Kardiomyopathie ist eine der Hauptursachen für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz. Der Prozess der zellulären Veränderungen, der zur kontraktilen Dysfunktion nach einem Myokardinfarkt führt, wird als „Remodelling“ bezeichnet. Allerdings sind die beteiligten Mechanismen, zurzeit noch nicht vollständig geklärt. Eine kontraktile Dysfunktion ist häufig mit einer Insulinresistenz vergesellschaftet. Insulin beeinflusst die Substratselektion und spielt eine wichtige Rolle in der mitochondrialen Biogenese. In vielen Modellen der Insulinresistenz bzw. des Diabetes ist eine mitochondriale Dysfunktion vorhanden. Allerdings ist unklar, ob eine solche Insulinresistenz bei der Entwicklung einer kontraktilen Dysfunktion frühzeitig nach einem Myokardinfarkt mitbeteiligt ist. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen der beschriebenen kontraktilen Dysfunktion und einer Insulinresistenz zu finden.

Methodik und Ergebnisse:

Bei erwachsenen (Gewicht 200-300g) Sprague-Dawley Ratten wurde mittels lateraler Thorakotomie die linke Koronararterie (LCA) ligiert und somit ein Myokardinfarkt ausgelöst. Alle Untersuchungen erfolgten 2 Wochen nach Infarkt. Die kontraktile Funktion des Herzens *in vivo* wurde mittels Echokardiographie beurteilt und zeigte sich nach dem Infarkt signifikant eingeschränkt. Die Pumpfunktion *in vitro* sowie die Glukoseaufnahme und die Substratoxidation wurden unter Verwendung von radioaktiv markierten Substraten mit Hilfe der isolierten Herzperfusion untersucht. Hierbei zeigte sich ebenfalls eine deutlich reduzierte Herzleistung. Die Glukoseoxidation war nicht beeinträchtigt. Allerdings war die basale (ohne Insulinstimulation) Fettsäureoxidation stark eingeschränkt. Zur Beurteilung der Insulinantwort wurde 30

Minuten nach Perfusionsbeginn Insulin zugegeben. Insulin steigert die Glukose-Aufnahme und -Oxidation sowie senkt die Fettsäureoxidation. Die Glukoseaufnahme zeigte zwischen beiden Gruppen, sowohl vor als auch nach Insulingabe, keinen Unterschied. Dementsprechend sahen wir keinen Unterschied in der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung und der GLUT4 mRNA-Expression. Dennoch zeigten sich die erwarteten Veränderungen der Substratoxidationsraten nach Insulingabe stark reduziert. Die Steigerung der Glukoseoxidation sowie die Senkung der Fettsäureoxidation waren wesentlich eingeschränkt.

Wir untersuchten die mRNA-Expression von Proteinen, die an der Substratoxidation und der mitochondrialen Biogenese involviert sind. Wir beobachteten eine signifikante Reduktion der Expression von Genen, welche an der Fettsäureoxidation beteiligt sind (PPAR- α , CPT-1, LCAD) was die Reduktion der FAO erklären könnte. Die Expression von TFAM, einem Transkriptionsfaktor der mitochondrialen Biogenese, nahm ebenfalls ab. PPAR- α und TFAM werden von PGC-1 α reguliert, einem Hauptregulator der mitochondrialen Biogenese. Daher bestimmten wir ebenfalls die Genexpression dieses Koaktivators. Wir fanden allerdings nach dem Myokardinfarkt keine Veränderung in der Expression von PGC-1 α . Da die PGC-1 α -Aktivität auch posttranskriptionell reguliert werden kann, untersuchten wir die Proteinexpression von p38MAPK, einem bekannte Regulator von PGC-1 α . Hierbei zeigte sich eine signifikante Reduktion von p38MAPK am nicht infarzierten Gewebe.

Schlussfolgerungen:

Myokardinfarkt-induziertes Remodeling bei Ratten ist durch eine Störung in der Fettsäureoxidation und eine verminderte Insulinantwort auf Ebene der Substratoxidation charakterisiert. Diese verminderte Insulinwirkung war mit einer verminderten Genexpression der Schlüsselregulatoren der mitochondrialen Biogenese verbunden. In Anbetracht der stimulie-

renden Wirkung von Insulin auf die mitochondriale Biogenese, kann man spekulieren, dass eine partielle IR an der Entwicklung einer mitochondrialen und kontraktilen Dysfunktion beteiligt ist.

2 EINLEITUNG

Ein Myokardinfarkt führt zu einer beeinträchtigten Kontraktilität des nicht ischämischen Herzmuskels (Swynghedauw 1999). Verschiedene Mechanismen sind beschrieben, um diese Dysfunktion zu erklären (Zarain-Herzberg et al. 1996). Ein ATP-Mangel wird häufig als Ursache für die Entwicklung einer kontraktilen Dysfunktion vorgeschlagen (Ingwall und Weiss 2004, Starling et al. 1998, Nascimben et al. 1996, Spindler et al. 1999). Die Mitochondrien sind die Hauptquelle von ATP im Herzmuskel, so dass es nicht überrascht, dass eine mitochondriale Dysfunktion oftmals mit eingeschränkter Kontraktilität assoziiert ist (Sharov et al. 1998, Sabbah et al. 1992, Jarreta et al. 2000, Hoppel et al. 1982). Insulin wirkt nicht nur auf die Substratoxidationsebene sondern auch auf die mitochondriale Biogenese (Brownsey et al. 1997). Dementsprechend zeigen verschiedene Modelle der Insulinresistenz eine mitochondriale und kontraktile Dysfunktion (Bugger und Abel 2008, Abel 2005).

Der Zusammenhang zwischen einem beeinträchtigten Glukosemetabolismus und einer kontraktilen Dysfunktion wird häufig beobachtet (Mihm et al. 2001, Mildenerger et al. 1984, Mytas et al. 2009). Es zeigte sich, dass bei einer Insulinresistenz eine hohe Prävalenz chronischer Herzinsuffizienz (HI) besteht und ebenfalls der Grad der Insulinresistenz mit dem Grad der Herzerkrankung korreliert (Swan et al. 1997). Darüber hinaus stellte sich Diabetes mellitus als ein prädisponierender Faktor für die Entwicklung einer HI heraus (He et al. 2001, Iribarren et al. 2001). Ebenso ist Diabetes ein unabhängiger Prädiktor für die Morbidität und Mortalität von Patienten mit HI (Shindler et al. 1996, Abel 2005, Doehner et al. 2005).

Verbesserte Therapiemöglichkeiten sowie die Alterung der Gesellschaft führen zu einer Steigerung der Prävalenz der HI (Cowie et al. 1997). Trotz ständig fortentwickelter Diagnostik und neuer Therapieoptionen bleiben die Prognosen für Patienten mit chronischer HI schlecht

(Krumholz et al. 2000, Taylor et al. 2012). Daher ist ein besseres Verständnis über die Mechanismen, welche eine kontraktile Dysfunktion hervorrufen, für eine Therapieoptimierung zwingend notwendig.

Wir untersuchten den kardialen Substratstoffwechsel und die kardiale Insulinempfindlichkeit nach einem Myokardinfarkt und vermuteten dass die mitochondriale Dysfunktion mit der Entwicklung der kontraktile Störungen in Zusammenhang steht. Die Integration der Ergebnisse und deren Interpretation erfordern einige Ausführungen über ischämische Kardiomyopathie, Herzstoffwechsel sowie Insulinwirkung und die Regulation der mitochondrialen Biogenese.

2.1 ISCHÄMISCHE KARDIOMYOPATHIE

Die koronare Herzerkrankung zählt als eine der Hauptursachen für die Entwicklung einer HI und ist meistens Folge eines Herzinfarktes. Myokardinfarkt wird als Absterben vom Herzgewebe infolge einer akuten Ischämie definiert. Kurz nach einem Myocytenuntergang kommt es zur Ausbildung eines Ödems und einer Entzündung am infarzierten Gewebe. Schlussendlich entwickelt sich eine Narbe mit Fibroblasten-Proliferation und Kollagenablagerung. In einigen Fällen kommt es zu einer Dilatation. Man geht davon aus, dass eine Dilatation entsteht wenn die nicht-kontraktile Fläche größer als 20-25% des linken Ventrikels ist (Klein et al. 1967, White et al. 1987). Gleichzeitig kommt es zu Muskelhypertrophie und Änderung der Herzkonfiguration (Sutton und Sharpe 2000). Dieser Prozess wird Remodelling genannt (Sutton und Sharpe 2000, McKay et al. 1986, Gaudron et al. 1993). Der komplexe Prozess des ventrikulären Remodelling sowie die Mechanismen, die zur kontraktile Dysfunktion führen, sind

jedoch noch nicht vollständig verstanden. Daher ist das Verständnis über der Energieerzeugungsprozess, der für die Muskelkontraktion notwendig ist, erforderlich.

2.2 GRUNDLAGE DES MYOKARDSTOFFWECHSELS

Um zu kontrahieren, muss das Myokard chemische Energie (ATP) in mechanische Arbeit umwandeln. ATP wird vorwiegend aus der Oxidation von Fettsäuren ($\approx 70\%$) und Glucose ($\approx 30\%$) gewonnen (Taegtmeyer 2007). Das Herz ist in der Lage seinen Bedarf an Energie aus den verschiedensten Quellen zu decken, beispielsweise durch die Oxidation von Fettsäuren, Glukose, Laktat und anderen Substraten. Das Mitochondrium ist der Hauptort der Energiegewinnung in den Zellen (Huss und Kelly 2005). Es stellt eine Grundlage für die Oxidation von energiereichen Substraten zur ATP Gewinnung dar. Unter normoxischen Bedingungen stammen etwa 95% des im Herzen produzierten ATP aus oxidativer Phosphorylierung in den Mitochondrien (Stanley et al. 2005). Die restlichen 5% werden in der Glykolyse und im Citrat-Zyklus generiert (Abb.1). Die meisten Substrate werden zu Acetyl-CoA abgebaut. Dies wird in den Citrat-Zyklus eingespeist und führt hier zur Produktion von Reduktionsäquivalenten (NADH , FADH_2) und GTP. Die Reduktionsäquivalente gelangen zur Atmungskette und geben dort ihre Elektronen durch die Komplexe der Atmungskette an Sauerstoff ab. An den Komplexen I, III und IV werden bei diesem Vorgang Protonen aus der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum gepumpt, was zur Generierung eines Protonengradienten führt. Dieser Protonengradient wird von der ATP-Synthase (Komplex V der Atmungskette) zur Produktion von ATP verwendet (Abb. 1) (Mitchell 1976).

2.2.1 DIE REGULATION DER GLUKOSEVERWERTUNG

Glukose muss in den Kardiomyozyten gelangen um oxidiert zu werden. Die Aufnahme von Glukose hängt von der Präsenz der Glukosetransporter an der Plasmamembran ab. Unter den beiden am Herzen exprimierten Glukosetransportern Glut1 und Glut4, trägt Glut4 den Hauptteil zur über Insulin gesteuerten Glukoseaufnahme bei (Zorzano et al. 1997, Abel 2004). Insulin induziert die Translokation von Glut4 vom intrazellulären Speicher an die sarkolemmale Membran und begünstigt so den Glukoseeintritt (Zorzano et al. 1997, Slot et al. 1991). Die Rolle der PI3K/Akt-Signalkaskade für die insulininduzierte Glut4-Translokation ist seit mehreren Jahren anerkannt (Watson und Pessin 2006) (Abb. 2). Die Insulin-induzierte Aktivierung der AKT führt zu einer vermehrten Einlagerung von Glukosetransportern (GLUT4) in die Zellmembran.

2.2.2 DIE REGULATION DES FETTSÄURESTOFFWECHSELS

Parallel zur Stimulation der Glukoseaufnahme induziert Insulin ebenfalls die Aufnahme von langkettigen Fettsäuren (LCFA) in die Kardiomyozyten (Coort et al. 2007, Glatz et al. 2006). Diese Stimulation kommt durch die insulinabhängige Translokation des LCFA Transporters FAT/CD36 zur Plasmamembran zustande (Abb. 1). Im Gegensatz zur Reaktion der Glukose folgt auf den Anstieg der intrazellulären LCFA Konzentration keine gesteigerte LCFA Oxidation, sondern eine Einlagerung des Überschusses in einem intrazellulären Lipidpool (Dyck et al. 2001). Wenn Glukose in die Zelle gelangt, resultiert aus dem erhöhten Pyruvat-Angebot eine gesteigerte Bildung von Malonyl-CoA, einem potenten Inhibitor von CPT1. CPT1 ist das limitierende Enzym für den Transfer von zytosolischen Langketten-Acyl-CoA-Molekülen in das Mitochondrium. (McGarry et al. 1977). Folglich wird bei einer steigenden zytosolischen

Konzentration von Malonyl-CoA die mitochondriale Aufnahme von LCFA gehemmt. Als Konsequenz daraus sinkt die Fettsäureoxidationsrate.

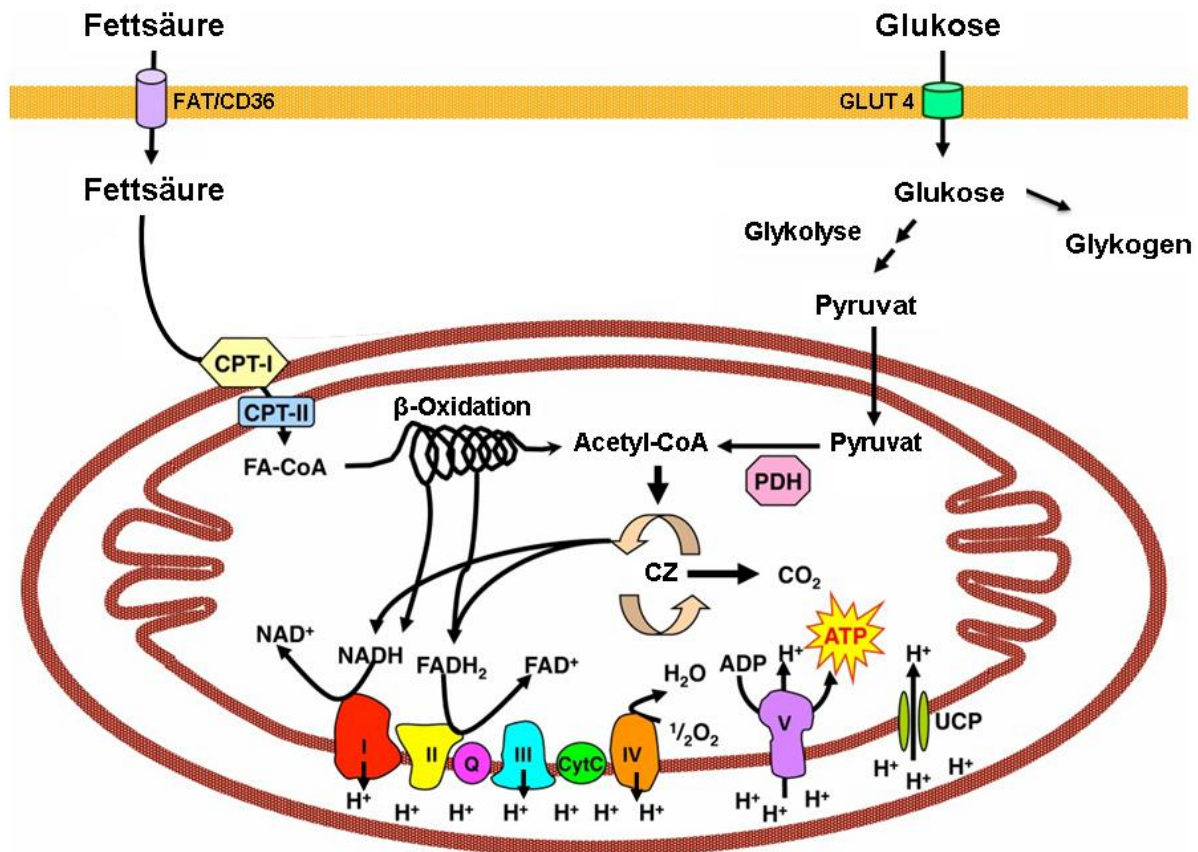


Abbildung 1: Vereinfachtes Schema der ATP-Gewinnung aus Glukose und Fettsäure in der Herzmuskelzelle. CPT: Carnitine Palmitoyl-transferase. FA-CoA: Fettsäure-Coenzym A, CZ: Citrat-Zyklus, CytC: Cytochrom-c, Q: Ubichinon, FAT/CD36: Fettsäure-Translocase, NAD: Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, FAD: Flavin-Adenin-Dinukleotid, ADP: Adenosindiphosphat, PDH: Pyruvatdehydrogenase

2.3 MITOCHONDRIALE BIOGENESE

Die mitochondriale Funktion in einem bestimmten Gewebe wird auf verschiedenen Ebenen reguliert, einschließlich der Anzahl und Dichte der Mitochondrien. Die Biogenese neuer Mitochondrien beinhaltet eine koordinierte Interaktion des nukleären und des mitochondrialen Genoms (Scarpulla 2008). Das mitochondriale Genom kodiert 13 Untereinheiten des mitochondrialen Atmungskomplexes, sowie tRNAs und rRNAs, welche für die Translation der mitochondrial kodierten Proteine nötig sind. Dafür kodiert das nukleäre Genom den größten Anteil mitochondrialer Proteine und ebenfalls die Transkriptionsfaktoren, welche für die Kontrolle der mitochondrialen Transkription verantwortlich sind. TFAM wird vom Kern kodiert, im Zytosol translatiert und über eine Reihe von Importkomplexen in die entsprechenden mitochondrialen Kompartimente importiert (Mossmann et al. 2012). Dies macht deutlich, dass die mitochondriale Biogenese ein extrem komplexer Prozess ist, welcher von einer außerordentlich feinen Organisation separater Genome und multipler zellulärer Prozesse abhängt.

Die Transkription und Replikation von mitochondrialer DNA wird durch TFAM angetrieben. TFAM interagiert mit den Promotoren von mehreren Genen der oxidativen Phosphorylierung, Atmungsketten-Komplexen und Enzymen die im Stoffwechsel beteiligt sind, einschließlich des „nuclear respiratory factor“ (NRF) (Garesse und Vallejo 2001). TFAM kann direkt durch PGC-1 α , aber auch indirekt durch seine Promotorbindungsstelle für NRFs reguliert werden (Braidotti et al. 1993). Der TFAM-Promoter enthält Erkennungsstellen für NRF1 und / oder NRF2, so dass eine Koordination zwischen einer mitochondrialen und einer nukleären Aktivierung während der mitochondrialen Biogenese erfolgt.

NRF 1 und 2 verknüpfen die Kontrolle einer Vielzahl von mitochondrialen Genen (Goretsky et al. 2004). Allerdings ist eine Untergruppe von Genen anscheinend nicht durch NRFs reguliert. Beispielsweise werden Fettsäure-Transportproteine und Oxidation-Enzym Gene, wie

z.B. long-chain acyl-CoA dehydrogenase (LCAD), hauptsächlich durch den „peroxisome proliferator-activated receptor alpha“ (PPAR α) reguliert (Finck und Kelly 2007).

Die PPARs sind ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren. Der wichtigste Transkriptionsregulator der Enzyme für die Fettsäureoxidation ist PPAR α . PPAR α reguliert die Expression von Genen aller Stufen der Fettsäureverwertung einschließlich mitochondrialem Transport (CPT-1) und mitochondrialer β -Oxidation (LCAD) (Brandt et al. 1998, Martin et al. 1997). Die Aktivität von PPAR α wird von PGC-1 α reguliert. (Barger und Kelly 2000).

PGC-1 α ist ein 90 kD-Protein, das zum einen mit Proteinen aus der Familie der nukleären Hormonrezeptoren (PPAR α , PPAR γ , TR β u.a.) interagiert und zum anderen die Expression und Aktivität von Transkriptionsfaktoren der mitochondrialen Biogenese reguliert (Puigserver et al. 1998, Knutti und Kralli 2001). PGC-1 α wird in Geweben mit hoher oxidativer Aktivität, wie Herz und braunem Fettgewebe angereichert und wird bei erhöhtem Energiebedarf wie Kälte, Training und Fasten rasch stimuliert (Lehman et al. 2000, Baar et al. 2002, Yoon et al. 2001). PGC-1 α kommt im Herzen in großen Mengen vor (Irrcher et al. 2003). Überexpression von PGC-1 α im Herzen führt zu vermehrter mitochondrialer Biogenese und einem erhöhten Sauerstoffverbrauch. PGC-1 α wird bei Veränderungen der Energieanforderungen im Herzen als der entscheidende Regulator der mitochondrialen Biogenese angesehen (Lehman et al. 2000). PGC-1 α hat selbst keine DNA-bindende Aktivität, sondern interagiert mit zahlreichen Transkriptionsfaktoren und aktiviert weitere Transkriptionsfaktoren, einschließlich NRFs auf dem Promoter von TFAM (Wu et al. 1999). Die Mitochondrienbiogenese und -atmung werden durch PGC-1 α vermittelte Induktion von NRF1 und NRF2 reguliert (Finck und Kelly 2006).

Die Expression von PGC-1 α korreliert, im Gegensatz zu NRFs oder TFAM mit der oxidativen Kapazität von Herz- und Skelett-Muskel, was darauf hindeutet, dass PGC-1 α eine wichtige Rolle bei der mitochondrialen Biogenese spielt (Garnier et al. 2003). Die Expression von PGC-1 α und NRF-1 ist bei Insulinresistenz und diabetischen Patienten reduziert (Patti et al. 2003). Zudem zeigen PGC-1 α -null Mäuse eine stark eingeschränkte Kontraktilität sowohl im Skelett- als auch im Herz-Muskel (Duncan et al. 2007, St-Pierre et al. 2003). Insulinresistente Patienten haben weniger Mitochondrien im Muskel, möglicherweise aufgrund einer eingeschränkten Aktivierung von PGC-1 α Zielgenen (Wu et al. 1999, St-Pierre et al. 2003).

Zusätzlich zur regulären Kontrolle der Expression durch zahlreiche metabolische Stimuli wird die Familie von PGC-1 α Koaktivatoren von posttranslationalen Modifikationen beeinflusst wie z.B. reversible Acetylierung/ Deacetylierung, welche ihre Aktivität fördern oder hemmen (Knutti et al. 2001, Puigserver et al. 2001). Die Aktivierung des „p38 mitogen-activated protein kinase“ (MAPK)-Signalweges im Skelettmuskel stimuliert die PGC-1 α Expression und ist deshalb als ein wichtiger Regulator der PGC-1 α Aktivität anzusehen (Wall et al. 2006).

2.4 INSULINWIRKUNG AM HERZEN

Nach der ersten Isolation von Insulin aus dem Pankreas in den frühen 1920er Jahren, waren Visscher und Muller wahrscheinlich die Ersten, die einen Effekt von Insulin im isoliert präparierten Herzen beschrieben (Visscher und Muller 1927). Es wurden zahlreiche Untersuchungen über den Effekt von Insulin auf die myokardiale Funktion und den Stoffwechsel durchgeführt. Die volle Identifikation der molekularen Signalwege, welche an der Insulinwirkung beteiligt sind, ist noch nicht vollständig abgeschlossen.

Die Bindung von Insulin an den extrazellulären Teil des Insulinrezeptors induziert die intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität. Ist der Rezeptor aktiviert und phosphoryliert, bindet er über seine Phosphotyrosinreste und phosphoryliert eine Reihe nachgeschalteter Elemente, unter anderem die Insulin Rezeptor Substrate (IRS) (Muniyappa et al. 2007, Avruch 1998, Saltiel und Kahn 2001, Thirone et al. 2006). Diese Rekrutierungs- und Aktivierungskaskade führt zu zwei Hauptpfaden. Sie aktivieren die Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Kaskade und den Mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Weg (Abb 2). PI3K scheint die Hauptrolle in der metabolischen Wirkung von Insulin zu spielen, während der MAPK-Weg hauptsächlich in Zellwachstum und Differenzierung involviert ist. Insulin induzierte PI3K-Rekrutierung an der Plasmamembran führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von Akt. Insulin ist ein äußerst potenter Aktivator von Akt im Herzen (Deprez et al. 2000). Akt spielt eine wichtige Rolle für den metabolischen Effekt von Insulin. Zum Beispiel scheint es essenziell für die Glukoseaufnahme in den Herzmuskel zu sein (Dummler und Hemmings 2007, DeBosch et al. 2006, Mora et al. 2005).

Im MAPK-Weg ist eines der wichtigsten Mitglieder der MAPK Familie p38 MAPK. p38 MAPK ist in der Regulation von Wachstum und Hypertrophie des Herzens involviert (Liang und Molkentin 2003) und die Inhibition des p38 MAPK-Weges über pharmakologische Hemmstoffe oder Adenoviren bewirkte eine Minderung des hypertrophen Effekts. (Liang und Molkentin 2003, Nemoto et al. 1998, Zechner et al. 1997). Darüber hinaus ist p38 MAPK über die Aktivierung von PGC-1 α im Skelettmuskel mit der mitochondrialen Biogenese verbunden. (Gibala et al. 2009). Trotz noch fehlender Evidenz für die Rolle von p38 MAPK im metabolischen Syndrom konnte gezeigt werden, dass eine Verstärkung des MAPK Signalwegs sowohl die Insulinsensitivität erhöhte, als auch die kardiale Hypertrophie fördert (Zechner et al. 1997).

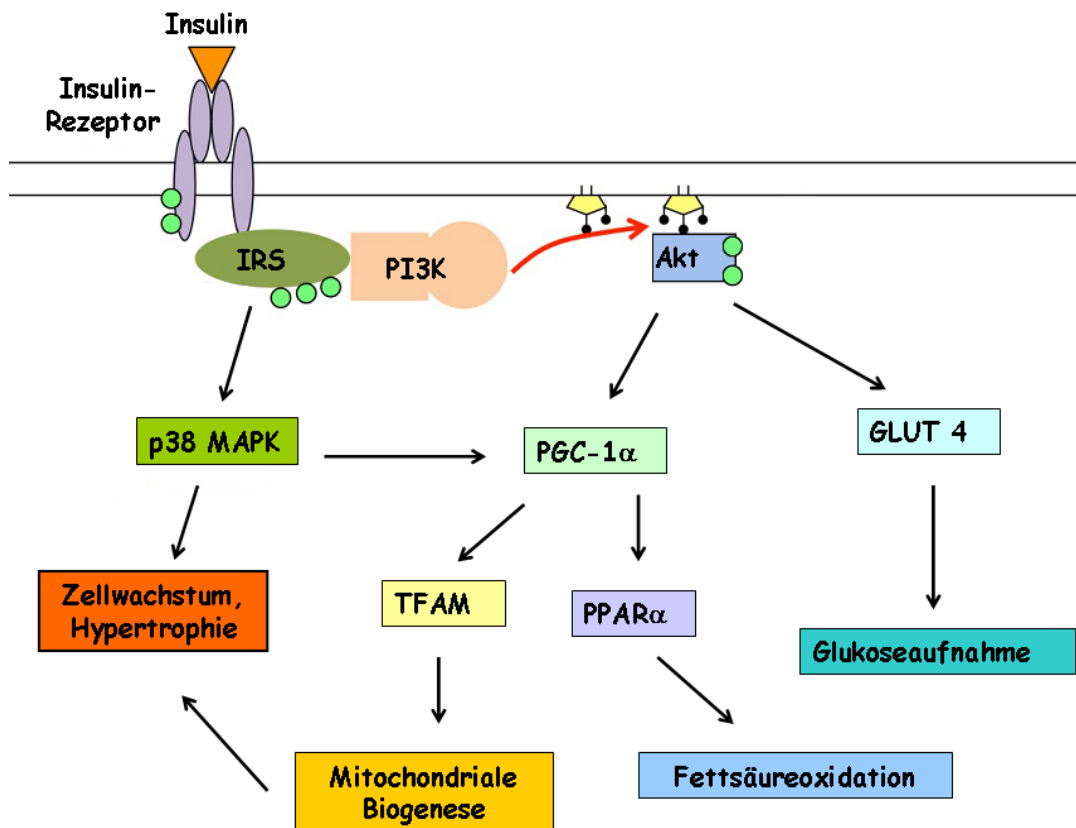


Abbildung 2: Vereinfachtes Schema der Insulinkaskade. Der akute Effekt ist durch eine Zunahme der Glukoseaufnahme gekennzeichnet. Zeitverzögert, z.T. durch Aktivierung von Transkriptionsprozessen, wird die mitochondriale Biogenese und selbst die Fettsäureoxidation gesteigert. IRS: insulin receptor substrate, PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase, AKT: Proteinkinase B, PPAR α : peroxisome proliferator activated-receptor- α , PGC-1 α : PPAR gamma co-activator 1 α , GLUT 4: Glukosetransporter Typ 4, TFAM: mitochondriale Transkriptionsfaktor A, MAPK: mitogen activated protein kinase.

2.5 INSULINRESISTENZ UND HERZINSUFFIZIENZ

Fast 30% der Menschen zwischen 40 und 79 Jahren entwickeln eine Insulinresistenz/Diabetes Mellitus Typ2 (Bonora et al. 1998) was für die große Bedeutung dieser Krankheit spielt. Der Zusammenhang zwischen einem beeinträchtigten Glukosestoffwechsel und einer kontraktile

Dysfunktion wurde mehrmals bestätigt (Mihm et al. 2001, Mildenerberger et al. 1984, Mytas et al. 2009). Es zeigte sich, dass bei einer Insulinresistenz eine hohe Prävalenz für chronische Herzinsuffizienz (HI) besteht und ebenfalls der Grad der Insulinresistenz (IR) mit dem Grad der Herzerkrankung korreliert (Swan et al. 1997). Darüber hinaus stellte sich Diabetes mellitus als ein prädisponierender Faktor für die Entwicklung einer chronischen HI heraus (He et al. 2001, Iribarren et al. 2001). Ebenso ist Diabetes ein unabhängiger Prädiktor für die Morbidität und Mortalität von Patienten mit chronischer HI (Doehner et al. 2003, Swan et al. 1997). Klinische Hinweise auf eine myokardiale Dysfunktion in Patientengruppen mit Diabetes, aber keiner anderen möglichen Ursache für Herzerkrankungen prägten sogar den Begriff "diabetische Kardiomyopathie" (Fang et al. 2004). Es ist jedoch wenig über die Auswirkungen einer Insulinresistenz im Herzmuskel bekannt.

3 ZIEL DER ARBEIT

In der vorliegenden Studie sollte der Einfluss eines Myokardinfarktes auf den kardialen Stoffwechsel und die kardiale Insulinempfindlichkeit untersucht werden.

4 PUBLIZIERTE ORIGINALARBEIT

Myocardial infarction in rats causes partial impairment in insulin response associated with reduced fatty acid oxidation and mitochondrial gene expression. Amorim PA*, Nguyen TD*, Shingu Y, Schwarzer M, Mohr FW, Schrepper A, Doenst T. J Thorac Cardiovasc Surg. 2010 Nov; 140(5):1160-7. (*geteilte Erstautorenschaft)

Myocardial infarction in rats causes partial impairment in insulin response associated with reduced fatty acid oxidation and mitochondrial gene expression

Paulo A. Amorim, MD,^a T. Dung Nguyen, BS,^a Yasushige Shingu, MD,^a Michael Schwarzer, PhD,^a Friedrich W. Mohr, MD, PhD,^a Andrea Schrepper, MS,^a and Torsten Doenst, MD, PhD^a

Objective: Myocardial infarction leads to contractile dysfunction. In patients with diabetes, impaired contractility has been associated with the loss of insulin effects and mitochondrial dysfunction. We assessed cardiac insulin sensitivity and mitochondrial and contractile function in rats after ligation of the left coronary artery.

Methods: At 2 weeks after left coronary artery ligation, we performed echocardiography in vivo and assessed the substrate use and insulin response in the isolated working heart and the regulation of insulin (Akt, glucose transporter type 4) and mitochondrial signaling (p38 mitogen-activated protein kinase, peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α , mitochondrial transcription factor A) using polymerase chain reaction and Western blotting.

Results: The infarcted hearts were dilated and had a reduced ejection fraction (ejection fraction < 50%). The basal glucose oxidation was preserved, but the fatty acid oxidation was significantly reduced. Insulin's effect on substrate oxidation was significantly impaired for both the decrease in fatty acid oxidation and the increase in glucose oxidation. However, insulin-stimulated glucose uptake was normal in the infarcted hearts, consistent with normal insulin-induced phosphorylation of Akt and unchanged mRNA expression of glucose transporter type 4. The impaired oxidative response to insulin was associated with reduced mRNA expression of the genes regulating fatty acid oxidation (long-chain-acyl-coenzyme A dehydrogenase, carnitine palmitoyltransferase 1, peroxisome proliferator-activated receptor- α) and mitochondrial biogenesis (mitochondrial transcription factor A). Although mRNA expression of the mitochondrial master regulator peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α was normal in the infarcted hearts, the protein expression of its post-transcriptional activator, p38 mitogen-activated protein kinase, was significantly reduced.

Conclusions: Myocardial infarction in rats caused partial insulin resistance at the level of substrate oxidation, which was associated with mitochondrial and cardiac contractile dysfunction. Mitochondrial dysfunction was characterized by a reduced capacity to oxidize fatty acids and might have resulted from impaired mitochondrial biogenesis through the lack of p38 mitogen-activated protein kinase. (*J Thorac Cardiovasc Surg* 2010;140:1160-7)

Myocardial infarction is the main cause of heart failure in the Western world.¹ The onset of heart failure after infarction is thought to occur because of a series of cellular changes leading to cardiac dysfunction, a process termed

“remodeling.”² Although this concept has been long known, the mechanisms involved in this setting are still unclear. Different mechanisms have been suggested as a cause of cardiac dysfunction. Several investigators have described “energy-starvation” concepts, implying the lack of adenosine triphosphate as a determinant of pump failure.^{3,4} These concepts brought the focus to the adenosine triphosphate-generating machinery of the cell (ie, the mitochondria) and the components regulating its function.

Insulin, in addition to affecting substrate selection, can influence mitochondrial biogenesis and function. The link between the loss of insulin's effects and impaired heart function has received specific attention with the recognition of diabetic cardiomyopathy.⁵ Studies in mouse models with a specific knockout of the cardiac insulin receptor (CIRKO mice) showed mitochondrial dysfunction and cardiomyopathy, suggesting cardiac insulin resistance as a potential mechanism for contractile dysfunction.⁶ However, whether cardiac insulin resistance is involved in infarction-induced contractile dysfunction is unknown. Therefore, we assessed

From the Department of Cardiac Surgery,^a University of Leipzig Heart Center, Leipzig, Germany.

Supported by individual grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to T. Doenst (grants Do602/3-2, 4-1, 6-1, 8-1, 9-1).

Disclosures: None.

Read at the 90th Annual Meeting of The American Association for Thoracic Surgery, Toronto, Ontario, Canada, May 1–5, 2010.

P. A. Amorim and T. D. Nguyen contributed equally to this work and are equal first authors.

T. Doenst is Heisenberg-Professor of the Deutsche Forschungsgemeinschaft at the University of Leipzig.

Received for publication March 31, 2010; revisions received July 31, 2010; accepted for publication Aug 4, 2010; available ahead of print Sept 20, 2010.

Address for reprints: Torsten Doenst, MD, PhD, Department of Cardiac Surgery, University of Leipzig Heart Center, Struempellstrasse 39, Leipzig 04289 Germany (E-mail: torsten.doenst@med.uni-leipzig.de).

0022-5223/\$36.00

Copyright © 2010 Published by Elsevier Inc. on behalf of The American Association for Thoracic Surgery

doi:10.1016/j.jtcvs.2010.08.003

Abbreviations and Acronyms

CPT-1	= carnitine palmitoyltransferase 1
GLUT4	= glucose transporter type 4
MAPK	= mitogen-activated protein kinase
LCAD	= long-chain-acyl-coenzyme A dehydrogenase
PGC-1 α	= peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α
PPAR α	= peroxisome proliferator-activated receptor- α
Tfam	= mitochondrial transcription factor A

the cardiac insulin response and cardiac contractile and mitochondrial function in a rat model of myocardial infarction.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The chemicals were obtained from Sigma Aldrich (Deisenhofen, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), Serva (Heidelberg, Germany), Essex (München, Germany), Bayer (Leverkusen, Germany), Narkodorm-n (Neumünster, Germany), Cell Signalling (Frankfurt am Main, Germany), and Bio-Rad Laboratories (München, Germany).

Animals and Surgical Interventions

Male Sprague-Dawley rats (weight 200–300 g) were obtained from Charles River Laboratories (Sulzfeld, Germany) or from the animal facility of the University of Leipzig and were fed ad libitum with free access to water at 21°C with a light cycle of 12 hours. The Animal Welfare Committee of the University of Leipzig (Leipzig, Germany) approved the use of the rats and the experimental protocols.

The infarct model in rats has been previously described in detail.⁷ To induce myocardial infarction, the rats were anesthetized with fentanyl, midazolam, and medetomidin (0.005 mg fentanyl/kg, 2 mg midazolam hydrochloride/kg, and 0.15 mg medetomidin hydrochloride/kg intramuscularly), intubated with 16-gauge tubing, and ventilated with room air (1 mL/100 g, 96 breaths/min). Lateral thoracotomy was performed, and, after visualization of the heart, the pericardium was gently open. The left coronary artery was localized using the pulmonary artery and the left atrium as anatomic markers. A 6-0 Prolene suture line was then used to ligate the coronary. After the thorax and skin were closed, the rats were extubated and kept on warming pads for the recovery periods. Age-matched, sham-operated rats that had undergone the same procedure without coronary occlusion were used as the control group.

After 2 weeks, echocardiography was conducted, and the hearts were harvested and used for the isolated working heart perfusion experiment (set 1), insulin stimulation ex vivo (set 2), or polymerase chain reaction and Western blot assessment (set 3). For sets 2 and 3, the hearts were excised and weighed. The scar tissue was macroscopically resected and weighed before the hearts were snap-frozen in liquid nitrogen. The scar areas were determined as the percentage of scar weight in relation to the heart weight. The scar area was not used for additional analysis.

Echocardiography

The rats were anesthetized with fentanyl, midazolam, and medetomidin, their chests were shaved, and they were examined in the supine position with a 12-MHz phased array transducer (Agilent/Philipps, Hamburg, Germany). Two-dimensional, parasternal, short-axis echocardiograms

were obtained from the left ventricle at the papillary muscle level. The fractional shortening was determined according to Teichholz and colleagues,⁸ and the ejection fraction was calculated according to Simpson's rule. Echocardiographic examinations were performed in 9 rats from the infarct group and 10 rats from the control group.

Isolated Working Heart Perfusion

The preparation for the isolated working heart perfusion has been previously described in detail.^{9,10} The rats were anesthetized with sodium pentobarbital (5 mg/100 g body weight intraperitoneally). After injection of heparin (200 IU) into the inferior vena cava, the heart was rapidly removed and placed in ice-cold Krebs-Henseleit bicarbonate buffer. The aorta was cannulated, and hearts were perfused as working hearts at 37°C, with recirculating Krebs-Henseleit buffer (200 mL) containing 1% bovine serum albumin, Cohn fraction V, fatty acid free (Celliance, Toronto, Ontario, Canada). The perfusate calcium concentration was 2.5 mM. The hearts were perfused with glucose (5 mM) and oleate (0.4 mM) as substrates. The perfusate was gassed with 95% oxygen and 5% carbon dioxide, and recirculated. All experiments were performed with a preload of 15 cm H₂O and an afterload of 100 cm H₂O. After stabilization, the hearts were perfused for 30 minutes, followed by an insulin addition (1 mU/mL), and another 30 minutes of perfusion. In this period, all samples were withdrawn and the measurements performed. The heart rate and systolic and diastolic aortic pressure were measured continuously using a Hugo Sachs transducer and recording system (TAM-A type 705/1; Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany). The heart rate was measured as the beats per minute and the cardiac output as millimeters per minute. The cardiac power was determined as follows: [flow (mL/min) \times pressure (100 cm H₂O)]/612 (correction factor).

Samples of the coronary effluent (2 mL) were withdrawn every 5 minutes for the assessment of glucose uptake and oxidation and fatty acid oxidation. The different rates were determined from the production of ¹⁴CO₂ from [U-¹⁴C] glucose and 3H₂O from [9,10-³H] oleate or [2-³H] glucose. These radioactive substrates allow the precise determination of glucose uptake ([2-³H] glucose), glucose oxidation ([U-¹⁴C] glucose) and fatty acid oxidation ([9,10-³H] oleate). Glucose and fatty acid oxidation were determined simultaneously during 10 heart perfusions for the control group and 9 for the infarct group. Glucose uptake was assessed in a separate set of perfusions (n = 5 in each group).

Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

Myocardial mRNA was isolated from frozen tissue samples using the Qiagen RNeasy mini kit. Synthesis of complementary DNA was performed with the cDNA synthesis kit from Fermentas (St. Leon-Rot, Germany), and TaqMan quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction was performed using AmpliTaq Gold (ABI; Applied Bio Systems, Darmstadt, Germany), with the conditions suggested by the manufacturer, on the ABI 7900 HT, as previously described.¹¹ Forward and reverse primers were designed using the Universal Probe Library Assay Design Center. For each set of primers, a basic local alignment search tool search revealed that sequence homology was obtained only for the target gene. The reaction mixture consisted of 1 μ L diluted template, 0.025 U/ μ L Taq Polymerase, 0.01 U/ μ L AmpErase, 5.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP mix, 1 \times TaqMan buffer A, 200 nM forward and reverse primers, and 100 nM probe. The results were normalized to S29 transcription as a housekeeping gene product, which was not different by experiment among all samples. The numbers of rats included ranged from 7 to 11 in each group.

Insulin Stimulation Ex Vivo

The hearts were harvested according to the protocol for the isolated working heart. After cannulation of the aorta, the hearts were retrogradely perfused with Krebs-Henseleit buffer at 37°C containing 5 mM glucose in the presence or absence of insulin (1 mU/mL) for

TABLE 1. Heart, lung, and body weights and fractional scar content of rats 2 weeks after left coronary artery ligation or sham operation

Variable	Sham group	Infarct group	<i>P</i> value
BW (g)	287 ± 5	308 ± 10	.05
HW (mg)	1513 ± 65	1639 ± 108	.31
HW/BW ratio	6.58 ± 0.07	6.23 ± 0.18	.77
LW/BW ratio	4.28 ± 0.10	4.22 ± 0.10	.68
Scar area (%)	NA	7.20 ± 0.74	NA

Data are presented as mean ± standard error of mean; n = 6–10/group. Scar area determined by macroscopically excising scar tissue and weighing it in relation to heart weight. *BW*, Body weight; *HW*, heart weight; *HW/BW*, heart weight/body weight; *LW/BW*, lung weight/body weight; *NA*, not applicable.

5 minutes and then immediately snap-frozen for analysis by Western blotting.

Immunoblotting

Western blots were performed on a semidry Western blot apparatus. After sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, the proteins were blotted to a polyvinylidene difluoride membrane and incubated with primary and secondary antibodies. The bands were visualized and semiquantified by chemiluminescence using AIDA software. At the end, the membrane was dyed with naphthol blue black solution to visualize the proteins and then used to normalize the band intensity. For Western blotting, the number of rats used was 8 for each group.

Statistical Analysis

The data are presented as the mean ± standard error of the mean. The data were analyzed using one-way analysis of variance or Student's *t* test, as appropriate. Post hoc comparisons among the groups were performed using the Holm-Sidak test.

RESULTS

Table 1 lists the heart, lung, and body weight of the infarcted and sham-operated groups. The rats with infarction weighed 7% more than the sham-operated rats. The heart weights were not significantly different between the 2 groups. The heart/body weight ratios were also normal in the infarct group, and no evidence was seen of pulmonary edema or significant pulmonary congestion, as demonstrated by the normal lung/body weight ratios. The macroscopically identified scar area caused by left coronary artery ligation was similar among the rats, with values of 5.6% to 9.8% of the total heart weight. The mortality after left coronary artery ligation was 17%. Of those that died, 12% had died perioperatively and the other 5% during the 2-week follow-up period.

Table 2 lists the echocardiographic parameters of the infarcted and sham-control groups. No difference was seen in the heart rate between the infarcted and control rats. Myocardial infarction led to significant dilation of the left ventricle, as demonstrated by a significant increase in the left ventricular end-diastolic diameter. The infarcted rat hearts had contractile dysfunction with a reduced left ventricular posterior wall at systole, ejection fraction, and fractional

TABLE 2. Cardiac size and function 2 weeks after left coronary artery ligation

Variable	Sham group (n = 6–10)	Infarct group (n = 6–10)	<i>P</i> value
Heart rate (beats/min)	270 ± 6	283 ± 8	.21
LVEDD (mm)	7.33 ± 0.16	9.62 ± 0.17	< .001
LVPWD (mm)	1.86 ± 0.18	1.75 ± 0.17	.66
LVPWS (mm)	2.72 ± 0.14	2.36 ± 0.08	< .001
Ejection fraction (%)	68.0 ± 2.6	36.1 ± 3.1	< .001
Fractional shortening (%)	41.4 ± 1.4	18.5 ± 1.8	.04
Cardiac power ex vivo (mW/g dry)	31.6 ± 1.8	22.9 ± 3.8	.03

Data are presented as mean ± standard error of mean. *LV*, Left ventricle; *LVEDD*, LV end-diastolic diameter; *LVPWD*, LV posterior wall in diastole; *LVPWS*, LV posterior wall in systole.

shortening (14%, 52%, and 45% less than that of the control rats, respectively). Ex vivo evaluation of cardiac function in the isolated working heart system also revealed impaired cardiac contraction (45% lower than in the sham-operated groups). No evidence of hypertrophy was seen 2 weeks after infarction, as demonstrated by the normal left ventricular posterior wall in diastole and heart/body weight ratios.

Figure 1 shows the substrate oxidation rates in the isolated working heart in the basal state and after insulin addition. Basal glucose oxidation was normal after infarction. However, fatty acid oxidation was significantly reduced at the basal levels. The insulin-induced stimulation of glucose oxidation and inhibition of fatty acid oxidation were significantly blunted at 2 weeks after infarction. The impairment in insulin response was evident from both the effect on the absolute values and the percentage of basal rates. In contrast to the oxidation rates, glucose uptake was normal both before and after insulin stimulation (Table 3). No evidence was seen for a lack of insulin response at this level, whether the insulin-induced increase was expressed in absolute values or as a percentage of the baseline values.

Insulin's effect on glucose uptake is mainly mediated through Akt-stimulated glucose transporter type 4 (GLUT4) translocation.¹² Akt is also a mediator of hypertrophy.¹³ Akt can be activated through phosphorylation at serine 473 and/or threonine 308 in response to insulin or hypertrophic stimuli.¹⁴ Figure 2 shows the total Akt expression and the phosphorylated fraction of Akt, with or without insulin stimulation, at both Akt phosphorylation sites. The total Akt level was normal in the infarcted hearts. Consistent with the lack of hypertrophy and the normal glucose uptake in the infarcted hearts, the basal and insulin-induced phosphorylation were the same in infarcted hearts and in those from the control group.

Figure 3 shows the mRNA expression of the genes involved in substrate use and the regulation of mitochondrial biogenesis. Although GLUT4 expression was normal

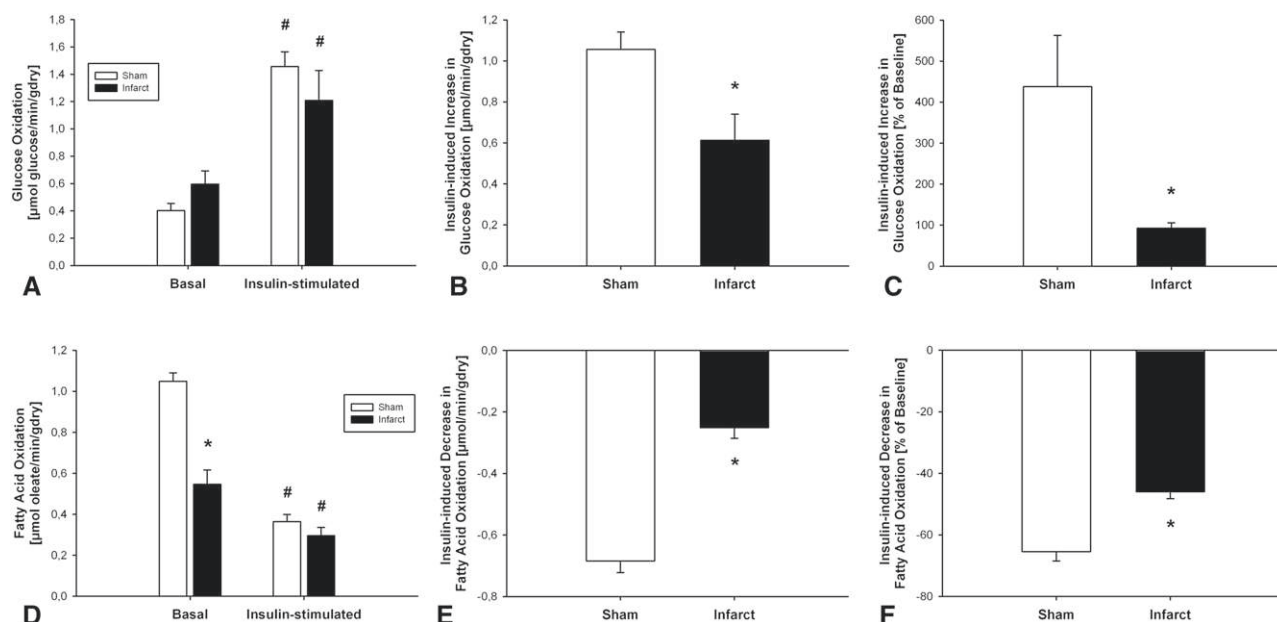


FIGURE 1. Substrate oxidation rates of isolated working rat hearts from rats that underwent left coronary artery ligation or a sham procedure and their response to insulin. A, Rates of basal and insulin-stimulated glucose oxidation. Insulin-stimulated increase in glucose oxidation as B, absolute values and C, percentage of basal rates. D, Rates of basal and insulin-stimulated fatty acid oxidation. Insulin-stimulated decrease in fatty acid oxidation as E, absolute values and F, percentage of baseline. Open bars indicate sham control group; solid bars, infarct group. Values presented as mean \pm standard error of mean; n = 5 to 7 per group. * $P < .05$ compared with control, # $P < .05$ compared with basal values of same group.

(Figure 3, A), a significant reduction was seen in the mRNA expression of carnitine palmitoyltransferase 1 and long-chain-acyl-coenzyme A dehydrogenase (Figure 3, B and C), which regulate mitochondrial fatty acid uptake and oxidation, respectively. These alterations are consistent with the reduced fatty acid oxidation rates of the infarcted hearts when perfused as isolated working hearts (Figure 1). Impaired fatty acid oxidation was also supported by the reduced expression of peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α) (Figure 3, D), the main transcription factor for all fatty acid oxidation genes (including long-chain-acyl-coenzyme A dehydrogenase). The expression of mitochondrial transcription factor A (Tfam) (Figure 3, E), the transcription factor regulating the expression of the mitochondrial genome (exclusively genes for the respiratory chain), was also significantly reduced. PPAR α and

Tfam are both targets of peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α), a metabolic co-activator and master mitochondrial regulator.¹⁵ PGC-1 α is regulated at both transcriptional and post-transcriptional levels. Figure 3, F shows that mRNA expression of PGC-1 α was normal 2 weeks after infarction. However, Figure 4 reveals a significant decrease in protein expression of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), a post-transcriptional activator of PGC-1 α .¹⁶

DISCUSSION

We have demonstrated that myocardial infarction in rats causes partial insulin resistance at the level of substrate oxidation in the remote myocardium. This cardiac insulin resistance is associated with mitochondrial and contractile dysfunction. Mitochondrial dysfunction is characterized by reduced fatty acid oxidation capacity and might be due to impaired mitochondrial biogenesis through a lack of p38 MAPK. The results suggest a role for cardiac insulin resistance and mitochondrial defects in ventricular remodeling and contractile dysfunction after myocardial infarction. If true, treatment of cardiac insulin resistance might improve contractile function and thereby help improve cardiac surgery outcomes because the preoperative ejection fraction is inversely correlated with perioperative mortality.¹⁷ Several aspects of our findings require additional discussion.

TABLE 3. Glucose uptake of infarcted isolated working rat hearts 2 weeks after left coronary artery ligation with or without insulin stimulation

Glucose uptake	Sham group (n = 5)	Infarct group (n = 5)	P value
Basal ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g dry}$)	1.62 \pm 0.22	2.36 \pm 0.70	.35
Insulin-stimulated ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g dry}$)	3.36 \pm 0.38	3.46 \pm 0.93	.92
Change			
Absolute value ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g dry}$)	1.73 \pm 0.29	1.09 \pm 0.48	.29
%	113 \pm 24	68 \pm 22	.21

Data are presented as mean \pm standard error of mean.

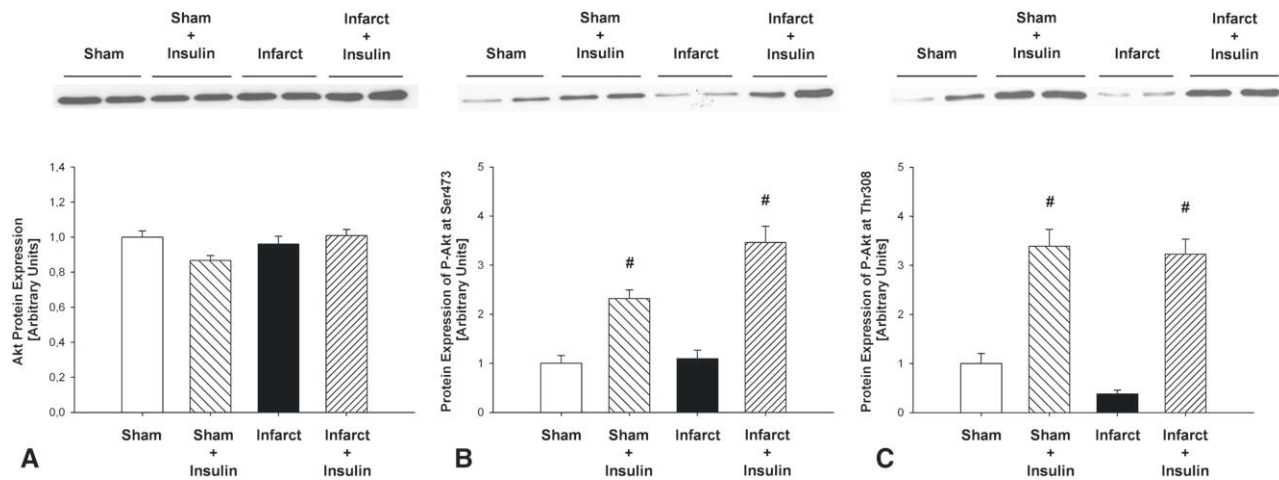


FIGURE 2. Basal and insulin-stimulated phosphorylation of Akt in infarcted and sham control hearts. A, Total protein expression of Akt. Level of phosphorylated Akt at B, Ser473 and C, Thr308 with (hatched bars) and without (solid bars) insulin stimulation in control and infarcted hearts. White solid bars indicate control group without insulin; light-hatched bars, control group with insulin; black solid bars, infarct group without insulin; and dark-hatched bars, infarct group with insulin. Representative Western blots shown. Values presented as mean \pm standard error of mean; n = 4 per group. # $P < .05$ compared with levels without insulin from same group.

The concept of a connection between insulin resistance and contractile dysfunction has been developed from the recognition that systemic insulin resistance predicts the heart failure incidence independently of diabetes and other established risk factors for heart failure.¹⁸ Although strong clinical evidence exists for this relationship, less is known about the underlying mechanisms. The term “systemic in-

sulin resistance” previously mentioned refers to impairment in insulin-stimulated glucose use, mainly in the skeletal muscle and adipose tissue. The heart is an insulin-sensitive organ; however, whether cardiac insulin resistance needs to be present when systemic insulin resistance is present is still unclear. In vivo studies of patients with diabetes using fluorodeoxyglucose-positron emission

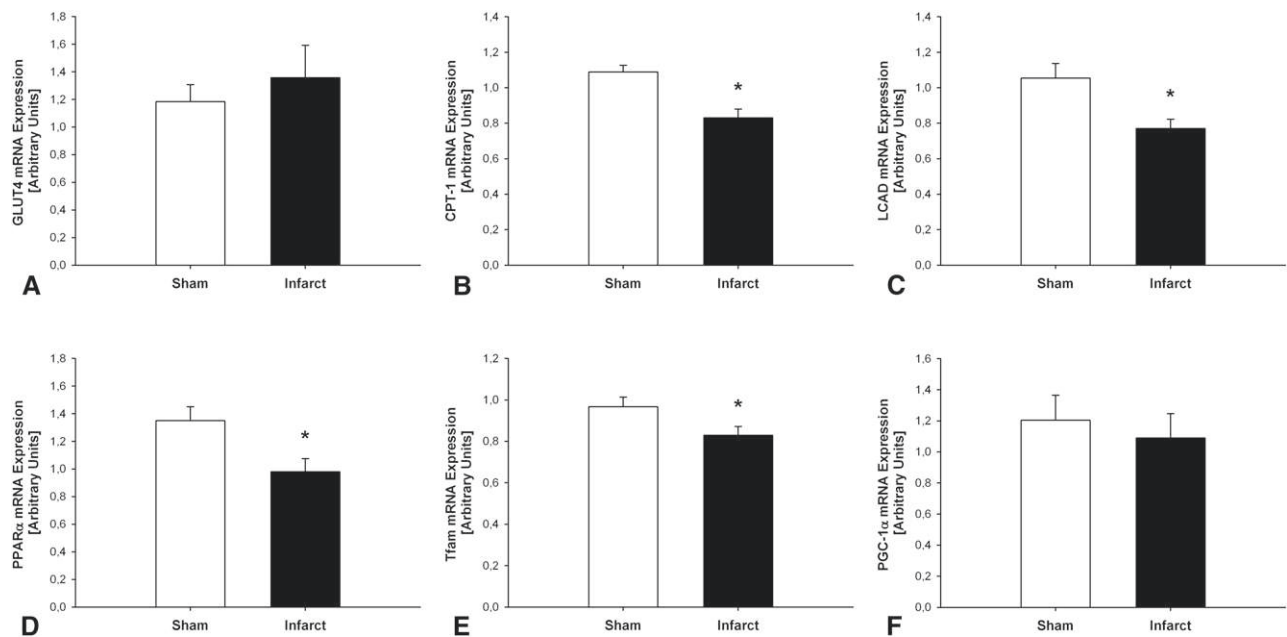


FIGURE 3. mRNA expression of genes involved in substrate use and mitochondrial biogenesis in infarcted and sham-control hearts. mRNA expression of A, glucose transporter type 4 (*GLUT4*); B, carnitine palmitoyltransferase 1 (*CPT-1*); C, long-chain-acyl-coenzyme A dehydrogenase (*LCAD*); D, peroxisome proliferator-activated receptor- α (*PPAR* α); E, mitochondrial transcription factor A (*Tfam*); and F, peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (*PGC-1* α). Values are presented as mean \pm standard error of mean, n = 8 to 10 per group. * $P < .05$ compared with control group.

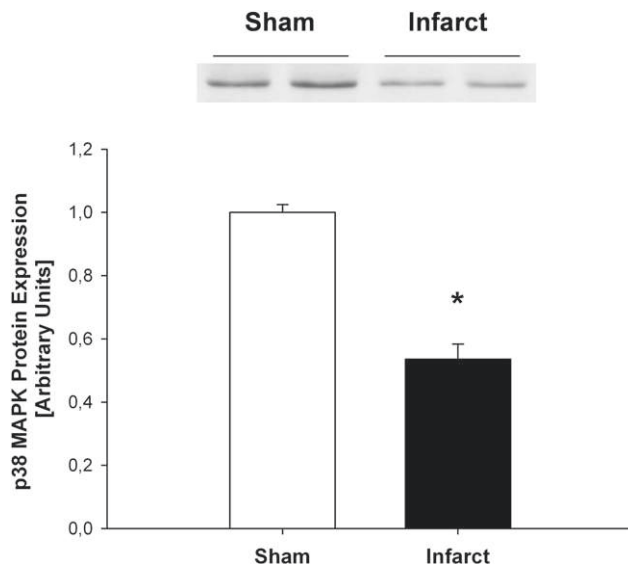


FIGURE 4. Protein expression of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) in sham-operated control and infarcted hearts. Representative Western blots shown. Values presented as mean \pm standard error of mean, $n = 4$ per group. * $P < .05$ compared with control group.

tomography techniques have shown normal insulin-stimulated myocardial glucose uptake¹⁹; however, the results are questionable owing to methodologic limitations.^{20,21} In contrast, animal models of systemic insulin resistance develop myocardial insulin resistance.²² Cardiac insulin resistance induced by specific knockout of the insulin receptor in the heart resulted in mitochondrial and contractile dysfunction.⁶ Thus, cardiac insulin resistance might represent a potential mechanism for heart failure by causing mitochondrial dysfunction.

We have demonstrated that myocardial infarction resulted in an impaired insulin response at the level of substrate oxidation but normal insulin-stimulated glucose uptake, supported by the unchanged insulin-induced Akt phosphorylation and normal GLUT4 gene expression. Although insulin-stimulated glucose uptake has been widely used as a marker for insulin sensitivity, insulin exerts many more effects on the substrate metabolism. For instance, insulin can boost glycolysis and glucose oxidation independently of glucose uptake.²³ Insulin can also activate glycogen synthesis and, importantly, insulin resistance in those with type 2 diabetes mellitus has been shown to be characterized by impaired glucose oxidation and glycogen synthesis, although glucose uptake is normal.²⁴ Other than its acute effects on the glucose metabolism, insulin regulates the expression of genes involved in cell growth and mitochondrial biogenesis.²⁵ Therefore, impairment of insulin's effects can develop at different levels, leading to partial insulin resistance. Thus, assessing insulin-stimulated glucose uptake and Akt phosphorylation alone might not fully reflect insulin sensitivity.

We had opted to perform our investigations at 2 weeks after inducing infarction, because it was our goal to assess the early changes in cardiac metabolism and insulin sensitivity after infarction. One other study has investigated cardiac insulin sensitivity of the heart 10 weeks after myocardial infarction.²⁶ The investigators found reduced insulin-stimulated glucose uptake and reduced GLUT4 expression. Although they did not assess insulin's effect on substrate oxidation, it is tempting to speculate that our observation of a reduced insulin effect on substrate oxidation and normal uptake response 2 weeks after infarction reflects the beginning of insulin resistance that could get worse during continued postinfarct remodeling.

The diminished insulin response at the level of substrate oxidation was associated with mitochondrial dysfunction. A standard method for the characterization of mitochondrial function is the measurement of the maximal respiratory capacity in isolated mitochondria. In the present study, we did not evaluate the mitochondrial respiration; thus, one could question the presence of mitochondrial dysfunction. However, we showed an overall decrease in fatty acid oxidation, which could be explained by the downregulation of carnitine palmitoyltransferase 1 and long-chain-acyl-coenzyme A dehydrogenase, as well as their transcriptional activator, the nuclear receptor, PPAR α . These alterations reflect true impairment in mitochondrial oxidative function in vivo, a situation that justifies the use of the term "mitochondrial dysfunction." In addition to oxidative dysfunction, mitochondrial biogenesis could also be impaired. This is characterized by reduced gene expression of Tfam, which plays a critical role in the construction of the respiratory chain complexes.²⁷ Both PPAR α and Tfam are downstream targets of PGC-1 α , the master metabolic co-activator governing substrate use and mitochondrial biogenesis.¹⁵ We found no change in PGC-1 α mRNA levels. However, the regulation of PGC-1 α is highly complex. Its activity is not only controlled by the levels of gene or protein expression but also by post-translational modification. The phosphorylation and acetylation status affects the activity of PGC-1 α significantly, but inhibition of PGC-1 α through its repressor is also an important mechanism. The binding of the repressor to PGC-1 α can be counteracted by p38 MAPK.¹⁶ Furthermore, exercise has been shown to activate PGC-1 α downstream targets in skeletal muscle through p38 MAPK, without increasing PGC-1 α protein levels.²⁸ In the present study, we showed decreased protein expression of p38 MAPK in association with downregulation of the PGC-1 α downstream targets (PPAR α , Tfam). These data would support the reduction in PGC-1 α signaling at the post-translational level, leading to impaired mitochondrial biogenesis and oxidative function.

In contrast to these interpretations, the coexistence of a reduced cardiac insulin response at the level of substrate oxidation and mitochondrial dysfunction could also be

interpreted differently. It could be used to question the presence of cardiac insulin resistance in our model. It is possible that a defect in the mitochondrial oxidative machinery results in a reduced ability to increase glucose oxidation after insulin stimulation. This would mean that the attenuated cardiac insulin response would only be an expression of impaired oxidative capacity but not of insulin resistance. However, 2 considerations argue against this interpretation. First, the response to insulin of both glucose and fatty acid oxidation were diminished. Thus, by definition, insulin resistance is present. Second, the basal rates of glucose oxidation in our model were normal, indicating competent glucose oxidative capacity and not impairment. Therefore, we believe that cardiac insulin resistance exists independent of mitochondrial oxidative defects.

The final issue requiring discussion is the relationship between cardiac insulin resistance and mitochondrial dysfunction. As mentioned, cardiac insulin resistance might cause mitochondrial and contractile dysfunction. Furthermore, it has recently been shown that impaired cardiac insulin signaling in CIRKO mice accelerated the development of mitochondrial dysfunction and worsened survival after myocardial infarction despite an equivalent infarct size.²⁹ However, whether partial cardiac insulin resistance 2 weeks after infarction causes mitochondrial dysfunction and contributes to ventricular remodeling remains unclear and warrants additional studies. Although cardiac insulin resistance could also be considered an epiphenomenon in this case, it can be seen as a marker for mitochondrial dysfunction and the ventricular remodeling process and could may thus serve as a risk factor for infarction-induced cardiac dysfunction.

CONCLUSIONS

Myocardial infarction in rats causes partial insulin resistance at the level of substrate oxidation, associated with mitochondrial and cardiac dysfunction. Mitochondrial dysfunction is characterized by a reduced capacity to oxidize fatty acids possibly because of impaired mitochondrial biogenesis through decreased p38 MAPK signaling.

We thank Anja Koeppen for technical assistance.

References

- Gheorghiade M, Bonow RO. Chronic heart failure in the United States: A manifestation of coronary artery disease. *Circulation*. 1998;97:282-9.
- Sun Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: Roles of local factors. *Cardiovasc Res*. 2009;81:482-90.
- Ingwall JS, Weiss RG. Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. *Circ Res*. 2004;95:135-45.
- Neubauer S. The failing heart—An engine out of fuel. *N Engl J Med*. 2007;356:1140-51.
- Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation*. 2007;115:3213-23.
- Boudina S, Bugger H, Sena S, O'Neill BT, Zaha VG, Ilkun O, et al. Contribution of impaired myocardial insulin signaling to mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the heart. *Circulation*. 2009;119:1272-83.
- Zaha V, Grohmann J, Gobel H, Geibel A, Beyersdorf F, Doenst T. Experimental model for heart failure in rats—Induction and diagnosis. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;51:211-5.
- Teichholz LE, Kreulen T, Herman MV, Gorlin R. Problems in echocardiographic volume determinations: Echocardiographic-angiographic correlations in the presence of absence of asynergy. *Am J Cardiol*. 1976;37:7-11.
- Bugger H, Schwarzer M, Chen D, Schreppe A, Amorim PA, Schoepe M, et al. Proteomic remodelling of mitochondrial oxidative pathways in pressure overload-induced heart failure. *Cardiovasc Res*. 2010;85:376-84.
- Schwarzer M, Britton SL, Koch LG, Wisloff U, Doenst T. Low intrinsic aerobic exercise capacity and systemic insulin resistance are not associated with changes in myocardial substrate oxidation or insulin sensitivity. *Basic Res Cardiol*. 2010;105:357-64.
- Doenst T, Pytel G, Schreppe A, Amorim P, Farber G, Shingu Y, et al. Decreased rates of substrate oxidation ex vivo predict the onset of heart failure and contractile dysfunction in rats with pressure overload. *Cardiovasc Res*. 2010;86:461-70.
- Wang Q, Somwar R, Bilan PJ, Liu Z, Jin J, Woodgett JR, et al. Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Mol Cell Biol*. 1999;19:4008-18.
- O'Neill BT, Kim J, Wende AR, Theobald HA, Tuinei J, Buchanan J, et al. A conserved role for phosphatidylinositol 3-kinase but not Akt signaling in mitochondrial adaptations that accompany physiological cardiac hypertrophy. *Cell Metab*. 2007;6:294-306.
- Ni YG, Berenji K, Wang N, Oh M, Sachan N, Dey A, et al. Foxo transcription factors blunt cardiac hypertrophy by inhibiting calcineurin signaling. *Circulation*. 2006;114:1159-68.
- Finck BN, Kelly DP. PGC-1 coactivators: Inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest*. 2006;116:615-22.
- Knutti D, Kressler D, Kralli A. Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:9713-8.
- Kay GL, Sun GW, Aoki A, Prejean CA Jr. Influence of ejection fraction on hospital mortality, morbidity, and costs for CABG patients. *Ann Thorac Surg*. 1995;60:1640-51.
- Ingelsson E, Sundstrom J, Arnlov J, Zethelius B, Lind L. Insulin resistance and risk of congestive heart failure. *JAMA*. 2005;294:334-41.
- Utriainen T, Takala T, Luotolahti M, Ronnema T, Laine H, Ruotsalainen U, et al. Insulin resistance characterizes glucose uptake in skeletal muscle but not in the heart in NIDDM. *Diabetologia*. 1998;41:555-9.
- Doenst T, Han Q, Goodwin GW, Guthrie PH, Taegtmeier H. Insulin does not change the intracellular distribution of hexokinase in rat heart. *Am J Physiol*. 1998;275(4 Pt 1):E558-67.
- Doenst T, Taegtmeier H. Profound underestimation of glucose uptake by [18F]2-deoxy-2-fluoroglucose in reperfused rat heart muscle. *Circulation*. 1998;97:2454-62.
- Mazumder PK, O'Neill BT, Roberts MW, Buchanan J, Yun UJ, Cooksey RC, et al. Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts. *Diabetes*. 2004;53:2366-74.
- Olefsky JM. Insulin's effect on glucose oxidation independent of glucose transport. *Biochem Biophys Res Commun*. 1976;71:106-13.
- Thorburn AW, Gumbiner B, Bulacan F, Wallace P, Henry RR. Intracellular glucose oxidation and glycogen synthase activity are reduced in non-insulin-dependent (type II) diabetes independent of impaired glucose uptake. *J Clin Invest*. 1990;85:522-9.
- Pagel-Langenickel I, Bao J, Joseph JJ, Schwartz DR, Mantell BS, Xu X, et al. PGC-1alpha integrates insulin signaling, mitochondrial regulation, and bioenergetic function in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 2008;283:22464-72.
- Murray AJ, Lygate CA, Cole MA, Carr CA, Radda GK, Neubauer S, et al. Insulin resistance, abnormal energy metabolism and increased ischemic damage in the chronically infarcted rat heart. *Cardiovasc Res*. 2006;71:149-57.
- Wang J, Silva JP, Gustafsson CM, Rustin P, Larsson NG. Increased in vivo apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:4038-43.
- Wright DC, Han DH, Garcia-Roves PM, Geiger PC, Jones TE, Holloszy JO. Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1alpha expression. *J Biol Chem*. 2007;282:194-9.
- Sena S, Hu P, Zhang D, Wang X, Waymunt B, Olsen C, et al. Impaired insulin signaling accelerates cardiac mitochondrial dysfunction after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;46:910-8.

5 DISKUSSION

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen die Wirkung eines Myokardinfarkts auf die kardiale Insulinempfindlichkeit. Im Unterschied zu bisherigen Studien untersuchten wir diese Effekte unter Berücksichtigung des kardialen Fettstoffwechsels. Wir konnten Evidenz dafür liefern, dass das Vorhandensein einer kardialen IR nach Myokardinfarkt bei Ratten mit einer eingeschränkten Fettsäureoxidation im Rahmen einer mitochondrialen Dysfunktion assoziiert ist. Die Ergebnisse liefern Hinweise darauf, dass eine Störung der mitochondrialen Biogenese im Rahmen einer IR mit als Ursache für eine kontraktile Dysfunktion nach Infarkt in Frage kommt.

Die eingeschränkte Kontraktilität zwei Wochen nach einem Myokardinfarkt wurde sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* beobachtet und trat im Zusammenhang mit einer kardialen IR auf. Eine kardiale IR ist bei verschiedenen Formen von Adipositas und Diabetes mellitus Typ2 mit kontraktile Dysfunktion assoziiert (Eckel et al. 1985, Razeghi et al. 2002). Mäuse mit selektiver kardiomyozytenspezifischer Deletion des Insulinrezeptors (CIRKO) zeigen eine reduzierte insulinstimulierte Glukoseaufnahme und ebenfalls eine gestörte kontraktile Funktion (McQueen et al. 2005). In CIRKO Mäusen begünstigt auch ein reduziertes myokardiales Insulin-signal oxidativen Stress und mitochondriale Entkopplung. Dieser Mechanismus wird als Ursache für kontraktile Dysfunktionen bei IR diskutiert (Boudina und Abel 2007).

Die präsentierte Studie veranschaulicht die Assoziation einer gesenkten Insulinantwort mit einer mitochondrialen Dysfunktion. Die geschilderten Störungen der mitochondrialen Funktion wurden sowohl in Tiermodellen als auch bei Menschen mit DM beschrieben (Boudina et al. 2005, Peterson et al. 2004, Scheuermann-Freestone et al. 2003). Isolierte Mitochondrien aus dem Herzen von OVE26 Mäusen, einer chronischen Modellvariante des Typ-1-DM, wie-

sen eine reduzierte maximale Atmungskapazität auf (Shen et al. 2004). Dies deutet auf eine beeinträchtigte mitochondriale Funktion hin. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in anderen Tiermodellen mit DM beschrieben (Kuo et al. 1983, Pierce und Dhalla 1985). Eine mitochondriale Störung wurde bei Mäusen mit Adipositas assoziiertem Diabetes mellitus (ob/ob) im Herzmuskel als Mechanismus für die kontraktile Dysfunktion angenommen (Boudina et al. 2005). Beeinträchtigungen der mitochondrialen Funktion wurden auch am Herzmuskel von Patienten mit Diabetes mellitus gezeigt (Anderson et al. 2009). Anderson et al. haben eine verringerte mitochondriale Atmungskapazität im Vorhofgewebe dieser Individuen gezeigt. Zusammen mit unseren Daten liefern diese Ergebnisse Hinweise für die Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion und oxidativer Kapazität im Herzen bei IR.

Wir fanden eine Minderung der Fettsäureoxidationsrate in der isolierten Herzperfusion zwei Wochen nach dem induzierten Herzinfarkt. Um diese Oxidationsstörung zu charakterisieren, haben wir uns mit der Regulation der Fettsäureoxidation befasst. Die in der β -Oxidation von Fettsäure beteiligten Proteine werden von sowohl transkriptionalen als auch posttranskriptionalen Mechanismen reguliert. Verschiedene Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression dieser Proteine. PPARs und PGC-1 α sind die bekanntesten Transkriptionsregulatoren der Fettsäure β -Oxidation. PPARs regulieren u.a. die Transkription von FATP, ACS, CD36/FAT, CPT1 und LCAD (Huss und Kelly 2004). Wir beobachteten eine reduzierte Expression von PPAR- α zwei Wochen nach Myokardinfarkt, welche mit einer Herabregulation von CPT-1 und LCAD assoziiert ist.

CPT-1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der kardialen Fettsäureoxidation. Wie oben erwähnt, katalysiert CPT-1 den Transfer von langkettigen Fettsäuren in die Mitochondrien und wird als der primäre Regulator der Fettsäureoxidationsrate angesehen (Abb.2). Wir konnten zeigen, dass die Genexpression von CPT-1 bei Ratten mit kardialer IR nach My-

okardinfarkt stark reduziert ist. Passend zu unseren Ergebnisse berichteten andere Arbeitsgruppen, dass die Fettsäureoxidationsrate und die fettsäureoxidativen Enzymaktivitäten (Kim et al. 2000, Kelley und Mandarino 2000) im Muskel von adipösen Probanden im Vergleich zu schlanken Probanden um bis zu 50% niedriger sind. Sie zeigten auch, dass sich die Expression von Markern der fettsäureoxidativen Kapazität, einschließlich CPT1 umgekehrt proportional zur Insulinresistenz verhalten (Simoneau et al. 1999). Diese Daten weisen auf einen möglichen Mechanismus für die reduzierte Fettsäureoxidation im Rahmen einer IR hin.

Eine IR kann auch zu mitochondrialer Dysfunktion durch Störungen in der PGC-1 α -Signalkaskade führen (Pagel-Langenickel et al. 2008). Die Expression von PGC-1 α zwei Wochen nach Herzinfarkt zeigte allerdings keine signifikante Änderung. Die Familie von PGC-1 α Co-Aktivatoren wird durch post-translationale Modifikationen gesteuert. Der Bindung des Repressors an PGC-1 α kann durch p38 MAPK entgegen gewirkt werden. Die p38-MAPK-vermittelte Phosphorylierung von PGC-1 α erhöht die Halbwertszeit des Proteins (Knutti et al. 2001). Eine Aktivierung des p38MAPK im Skelettmuskel steigert die Expression von PGC-1 α (Akimoto et al. 2005). p38 MAPK kann aber auch zu eine Aktivierung von PGC-1 α und nachgeschalteter Kaskaden führen, ohne die PGC-1 α Expression zu erhöhen (Wright et al. 2007). Zudem konnte an der Ratte durch Insulin eine Aktivierung von p38MAPK im Skelettmuskel nachgewiesen werden (Somwar et al. 2000). In unserer Studie beobachteten wir eine reduzierte Proteinexpression von p38 MAPK, welche die Herabregulation von PGC-1 α Zielgenen (PPAR- α , TFAM) erklären könnte. Diese Daten unterstützen die Theorie, dass eine Beeinträchtigung im PGC-1 α -Signalweg auf posttranslationaler Ebene, im Rahmen eine kardiale IR, zu einer gesenkten mitochondrialen Biogenese und einer gesenkten oxidativen Funktion führen kann.

Wir haben eine kardiale IR vor dem Vorhandensein der mitochondrialen Dysfunktion in einem Drucküberlastungsmodell beobachtet, welche ein Hinweis für eine mögliche Rolle der IR in der Entstehung einer HI sein könnte (Schwarzer et al. 2008). Das Vorhandensein einer kardialen IR wurde bei hypertrophen Kardiomyopathien gezeigt, wobei eine mitochondriale Dysfunktion als Ursache für die Verschlechterung der Herzfunktion angenommen wurde (Zhang et al. 2013). Andere Gruppen haben die Existenz von kardialer IR mit ATP-Mangel 10 Wochen nach Myokardinfarkt gezeigt und kommen zum Schluss, dass dies IR zur Entwicklung der HI auch in diesem Modell beitragen könnte (Murray et al. 2006, Murray et al. 2008). Die könnte ein Hinweis für die Korrelation zwischen IR und mitochondrialer Dysfunktion beim Auftreten einer HI sein.

Limitationen:

Die vorliegende Arbeit weist einige Limitierungen auf, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden sollten. Als Erstes sei genannt, dass die Charakterisierung einer mitochondrialen Dysfunktion in unserem Modell über eine reduzierte Fettsäureoxidation *ex vivo* durchgeführt wurde. Ein Standardverfahren zur Charakterisierung der mitochondrialen Funktion ist das Messen der maximalen respiratorischen Kapazität an isolierten Mitochondrien. In der vorliegenden Studie evaluierten wir nicht die mitochondriale Atmung, wodurch man die Annahme des Vorhandenseins einer mitochondrialen Dysfunktion in Frage stellen könnte. Allerdings wiesen wir ein generelles Absinken der Fettsäureoxidation nach. Dies könnte durch die Herabregulation von CPT-1, der LCAD, sowie PPAR α erklärt werden. Diese Änderungen spiegeln die reale Beeinträchtigung der mitochondrialen oxidativen Funktion *in vivo* wieder und rechtfertigen so den Begriff "mitochondriale Dysfunktion".

Unsere Daten belegen die Existenz kardialer Insulinresistenz auf Basis der Substratoxidation zwei Wochen nach einem Myokardinfarkt. Wir beobachteten keine Veränderung in der Glukoseaufnahme in Übereinstimmung mit einer normalen insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung und Glut4 Expression. Daher sollte die IR in diesem Model als partiell betrachtet werden. Obwohl die Glukoseaufnahme gewöhnlich als Marker für die Insulinantwort genutzt wird, stimuliert Insulin zahlreiche Vorgänge bezüglich Substratmetabolismus und Glykogensynthese. Somit kann die Glykolyse und die Glukoseoxidation unabhängig von der Glukoseaufnahme stimuliert werden (Olefsky 1976). Anders als die sofortigen Effekte auf den Metabolismus reguliert Insulin die Expression von Genen, welche Einfluss auf Zellwachstum und mitochondriale Biogenese haben (Pagel-Langenickel et al. 2008). Bedeutend ist, dass Typ-2DM durch geringere Glukoseoxidation bei erhaltener Glukoseaufnahme charakterisiert ist. (Thorburn et al. 1990). Zusätzlich wurde schon vorher über partielle Insulinresistenz bei Patienten und Tiermodellen mit IR berichtet (Jiang et al. 1999, Cusi et al. 2000). So können Beeinträchtigungen in der Insulinwirkung auf verschiedenen Ebenen zu partieller Insulinresistenz führen. Somit kann über die Bewertung der insulinstimulierten Glukoseaufnahme und über die Akt Phosphorylierung allein die Insulinsensitivität nicht vollständig reflektiert werden.

Im Gegensatz zur obigen Interpretation kann die Koexistenz einer reduzierten kardialen Insulinantwort auf Basis der Substratoxidation und mitochondrialen Dysfunktion auch anders interpretiert werden. Es wäre möglich zu argumentieren, dass der Defekt im mitochondrialen Oxidationsmechanismus in der fehlenden Fähigkeit liegt, nach einem Insulinstimulus die Glukoseoxidation zu erhöhen. Das bedeutet, dass die abgeschwächte kardiale Insulinantwort nur ein Ausdruck gesenkter oxidativer Kapazität, jedoch nicht von Insulinresistenz ist. Allerdings sprechen zwei Überlegungen gegen diese Interpretation. Erstens: die Insulinantwort auf

Glukose und Fettsäureoxidation war vermindert. Folglich besteht per definitionem eine Insulinresistenz. Zweitens: die basalen Glukoseoxidationsraten in unserem Modell waren nicht gesenkt. Daher sehen wir, dass eine kardiale Insulinresistenz tatsächlich auch unabhängig von mitochondrialer oxidativer Kapazität existieren kann.

Am Schluss stellt sich die Frage nach dem Zusammenhang zwischen kardialer Insulinresistenz und einer mitochondrialen Dysfunktion. Wie schon erwähnt, kann kardiale Insulinresistenz eine mitochondriale und kontraktile Dysfunktion auslösen. Weiterhin zeigte sich, dass ein vermindertes kardiales Insulinsignal in CIRKO Mäusen die Entwicklung mitochondrialer Dysfunktionen beschleunigte und die Überlebenswahrscheinlichkeit trotz äquivalenter Infarktgrösse zur Vergleichsgruppe verschlechterte (Sena et al. 2009). Ob jedoch eine partielle kardiale Insulinresistenz zwei Wochen nach einem Infarktgeschehen eine mitochondriale Dysfunktion auslöst und ventrikuläres Remodelling fördert, bleibt unklar und bedarf weiterer Studien. Obwohl kardiale Insulinresistenz in diesem Fall auch als Begleitphänomen betrachtet werden könnte, kann sie ebenfalls als Marker für mitochondriale Dysfunktion und den ventrikulären Remodellingprozess gesehen werden. Sie könnte somit auch einen Risikofaktor für infarktinduzierte kardiale Dysfunktionen darstellen.

6 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass eine myokardiale Infarzierung bei Ratten zu einer partiellen Insulinresistenz auf Ebene der Substratoxidation führte. Wir konnten beweisen, dass die Beeinträchtigung der Insulinantwort mit einer mitochondrialen und kontraktile Dysfunktion vergesellschaftet ist. In diesem Fall ist die mitochondriale Dysfunktion durch

eine eingeschränkte Kapazität der Fettsäureoxidation gekennzeichnet. Dies basiert möglicherweise auf der Beeinträchtigung der mitochondrialen Biogenese. Die reduzierte Expression von Genen, welche in die mitochondriale Biogenese involviert sind, kann wiederum durch einen geschwächten p38 MAPK-Signalweg erklärt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Insulinresistenz aufgrund der verschlechterten mitochondrialen Funktion eine wichtige Rolle für Störungen der kontraktilen Funktion nach einem Myokardinfarkt spielt.

7 LITERATUR UND QUELLENVERZEICHNIS

- Abel ED. 2004. Glucose transport in the heart. *Front Biosci*, 9:201-215.
- Abel ED. 2005. Myocardial insulin resistance and cardiac complications of diabetes. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 5 (2):219-226.
- Akimoto T, Pohnert SC, Li P, Zhang M, Gumbs C, Rosenberg PB, Williams RS, Yan Z. 2005. Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J Biol Chem*, 280 (20):19587-19593.
- Anderson EJ, Kypson AP, Rodriguez E, Anderson CA, Lehr EJ, Neuffer PD. 2009. Substrate-specific derangements in mitochondrial metabolism and redox balance in the atrium of the type 2 diabetic human heart. *J Am Coll Cardiol*, 54 (20):1891-1898.
- Avruch J. 1998. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem*, 182 (1-2):31-48.
- Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M, Kelly DP, Holloszy JO. 2002. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J*, 16 (14):1879-1886.
- Barger PM, Kelly DP. 2000. PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism. *Trends Cardiovasc Med*, 10 (6):238-245.
- Bonora E, Kiechl S, Willeit J, Oberhollenzer F, Egger G, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Muggeo M. 1998. Prevalence of insulin resistance in metabolic disorders: the Bruneck Study. *Diabetes*, 47 (10):1643-1649.
- Boudina S, Abel ED. 2007. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation*, 115 (25):3213-3223.
- Boudina S, Sena S, O'Neill BT, Tathireddy P, Young ME, Abel ED. 2005. Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. *Circulation*, 112 (17):2686-2695.
- Brandt JM, Djouadi F, Kelly DP. 1998. Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem*, 273 (37):23786-23792.
- Brownsey RW, Boone AN, Allard MF. 1997. Actions of insulin on the mammalian heart: metabolism, pathology and biochemical mechanisms. *Cardiovasc Res*, 34 (1):3-24.
- Bugger H, Abel ED. 2008. Molecular mechanisms for myocardial mitochondrial dysfunction in the metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond)*, 114 (3):195-210.

- Coort SL, Bonen A, van der Vusse GJ, Glatz JF, Luiken JJ. 2007. Cardiac substrate uptake and metabolism in obesity and type-2 diabetes: role of sarcolemmal substrate transporters. *Mol Cell Biochem*, 299 (1-2):5-18.
- Cowie MR, Mosterd A, Wood DA, Deckers JW, Poole-Wilson PA, Sutton GC, Grobbee DE. 1997. The epidemiology of heart failure. *Eur Heart J*, 18 (2):208-225.
- Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, DeFronzo RA, Kahn CR, Mandarino LJ. 2000. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest*, 105 (3):311-320.
- DeBosch B, Sambandam N, Weinheimer C, Courtois M, Muslin AJ. 2006. Akt2 regulates cardiac metabolism and cardiomyocyte survival. *J Biol Chem*, 281 (43):32841-32851.
- Deprez J, Bertrand L, Alessi DR, Krause U, Hue L, Rider MH. 2000. Partial purification and characterization of a wortmannin-sensitive and insulin-stimulated protein kinase that activates heart 6-phosphofructo-2-kinase. *Biochem J*, 347 Pt 1:305-312.
- Doehner W, Godsland IF, Rauchhaus M, Ponikowski PP, Coats AJ, Anker SD. 2003. Insulin resistance and survival in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 41 (suppl A):158A-.
- Doehner W, Rauchhaus M, Ponikowski P, Godsland IF, von Haehling S, Okonko DO, Leyva F, Proudler AJ, Coats AJ, Anker SD. 2005. Impaired insulin sensitivity as an independent risk factor for mortality in patients with stable chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 46 (6):1019-1026.
- Dummler B, Hemmings BA. 2007. Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochem Soc Trans*, 35 (Pt 2):231-235.
- Duncan JG, Fong JL, Medeiros DM, Finck BN, Kelly DP. 2007. Insulin-resistant heart exhibits a mitochondrial biogenic response driven by the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha/PGC-1alpha gene regulatory pathway. *Circulation*, 115 (7):909-917.
- Dyck DJ, Steinberg G, Bonen A. 2001. Insulin increases FA uptake and esterification but reduces lipid utilization in isolated contracting muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 281 (3):E600-607.
- Eckel J, Wirdeier A, Herberg L, Reinauer H. 1985. Insulin resistance in the heart: studies on isolated cardiocytes of genetically obese Zucker rats. *Endocrinology*, 116 (4):1529-1534.

- Fang ZY, Prins JB, Marwick TH. 2004. Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. *Endocr Rev*, 25 (4):543-567.
- Finck BN, Kelly DP. 2006. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest*, 116 (3):615-622.
- Finck BN, Kelly DP. 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. *Circulation*, 115 (19):2540-2548.
- Garesse R, Vallejo CG. 2001. Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene*, 263 (1-2):1-16.
- Garnier A, Fortin D, Delomenie C, Momken I, Veksler V, Ventura-Clapier R. 2003. Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J Physiol*, 551 (Pt 2):491-501.
- Gaudron P, Eilles C, Kugler I, Ertl G. 1993. Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors. *Circulation*, 87 (3):755-763.
- Gibala MJ, McGee SL, Garnham AP, Howlett KF, Snow RJ, Hargreaves M. 2009. Brief intense interval exercise activates AMPK and p38 MAPK signaling and increases the expression of PGC-1alpha in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985), 106 (3):929-934.
- Glatz JF, Bonen A, Ouwens DM, Luiken JJ. 2006. Regulation of sarcolemmal transport of substrates in the healthy and diseased heart. *Cardiovasc Drugs Ther*, 20 (6):471-476.
- Goretsky MJ, Kelly RE, Jr., Croitoru D, Nuss D. 2004. Chest wall anomalies: pectus excavatum and pectus carinatum. *Adolesc Med Clin*, 15 (3):455-471.
- He J, Ogden LG, Bazzano LA, Vupputuri S, Loria C, Whelton PK. 2001. Risk factors for congestive heart failure in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study. *Arch Intern Med*, 161 (7):996-1002.
- Hoppel CL, Tandler B, Parland W, Turkaly JS, Albers LD. 1982. Hamster cardiomyopathy. A defect in oxidative phosphorylation in the cardiac interfibrillar mitochondria. *J Biol Chem*, 257 (3):1540-1548.
- Huss JM, Kelly DP. 2004. Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circ Res*, 95 (6):568-578.
- Huss JM, Kelly DP. 2005. Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *J Clin Invest*, 115 (3):547-555.

- Ingwall JS, Weiss RG. 2004. Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. *Circ Res*, 95 (2):135-145.
- Iribarren C, Karter AJ, Go AS, Ferrara A, Liu JY, Sidney S, Selby JV. 2001. Glycemic control and heart failure among adult patients with diabetes. *Circulation*, 103 (22):2668-2673.
- Jarreta D, Orus J, Barrientos A, Miro O, Roig E, Heras M, Moraes CT, Cardellach F, Casademont J. 2000. Mitochondrial function in heart muscle from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*, 45 (4):860-865.
- Jiang ZY, Lin YW, Clemont A, Feener EP, Hein KD, Igarashi M, Yamauchi T, White MF, King GL. 1999. Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. *J Clin Invest*, 104 (4):447-457.
- Kelley DE, Mandarino LJ. 2000. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes*, 49 (5):677-683.
- Kim JY, Hickner RC, Cortright RL, Dohm GL, Houmard JA. 2000. Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 279 (5):E1039-1044.
- Klein MD, Herman MV, Gorlin R. 1967. A hemodynamic study of left ventricular aneurysm. *Circulation*, 35 (4):614-630.
- Knutti D, Kralli A. 2001. PGC-1, a versatile coactivator. *Trends Endocrinol Metab*, 12 (8):360-365.
- Knutti D, Kressler D, Kralli A. 2001. Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (17):9713-9718.
- Krumholz HM, Chen YT, Wang Y, Vaccarino V, Radford MJ, Horwitz RJ. 2000. Predictors of readmission among elderly survivors of admission with heart failure. *Am Heart J*, 139 (1 Pt 1):72-77.
- Kuo TH, Moore KH, Giacomelli F, Wiener J. 1983. Defective oxidative metabolism of heart mitochondria from genetically diabetic mice. *Diabetes*, 32 (9):781-787.
- Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest*, 106 (7):847-856.
- Liang Q, Molkentin JD. 2003. Redefining the roles of p38 and JNK signaling in cardiac hypertrophy: dichotomy between cultured myocytes and animal models. *J Mol Cell Cardiol*, 35 (12):1385-1394.

- Martin G, Schoonjans K, Lefebvre AM, Staels B, Auwerx J. 1997. Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. *J Biol Chem*, 272 (45):28210-28217.
- McGarry JD, Mannaerts GP, Foster DW. 1977. A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J Clin Invest*, 60 (1):265-270.
- McKay RG, Pfeffer MA, Pasternak RC, Markis JE, Come PC, Nakao S, Alderman JD, Ferguson JJ, Safian RD, Grossman W. 1986. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion. *Circulation*, 74 (4):693-702.
- McQueen AP, Zhang D, Hu P, Swenson L, Yang Y, Zaha VG, Hoffman JL, Yun UJ, Chakrabarti G, Wang Z, Albertine KH, Abel ED, Litwin SE. 2005. Contractile dysfunction in hypertrophied hearts with deficient insulin receptor signaling: possible role of reduced capillary density. *J Mol Cell Cardiol*, 39 (6):882-892.
- Mihm MJ, Seifert JL, Coyle CM, Bauer JA. 2001. Diabetes related cardiomyopathy time dependent echocardiographic evaluation in an experimental rat model. *Life Sci*, 69 (5):527-542.
- Mildenberger RR, Bar-Shlomo B, Druck MN, Jablonsky G, Morch JE, Hilton JD, Kenshole AB, Forbath N, McLaughlin PR. 1984. Clinically unrecognized ventricular dysfunction in young diabetic patients. *J Am Coll Cardiol*, 4 (2):234-238.
- Mitchell P. 1976. Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *J Theor Biol*, 62 (2):327-367.
- Mora A, Sakamoto K, McManus EJ, Alessi DR. 2005. Role of the PDK1-PKB-GSK3 pathway in regulating glycogen synthase and glucose uptake in the heart. *FEBS Lett*, 579 (17):3632-3638.
- Mossmann D, Meisinger C, Vogtle FN. 2012. Processing of mitochondrial presequences. *Biochim Biophys Acta*, 1819 (9-10):1098-1106.
- Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. 2007. Cardiovascular actions of insulin. *Endocr Rev*, 28 (5):463-491.
- Murray AJ, Lygate CA, Cole MA, Carr CA, Radda GK, Neubauer S, Clarke K. 2006. Insulin resistance, abnormal energy metabolism and increased ischemic damage in the chronically infarcted rat heart. *Cardiovasc Res*, 71 (1):149-157.
- Murray AJ, Cole MA, Lygate CA, Carr CA, Stuckey DJ, Little SE, Neubauer S, Clarke K. 2008. Increased mitochondrial uncoupling proteins, respiratory uncoupling and

- decreased efficiency in the chronically infarcted rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, 44 (4):694-700.
- Mytas DZ, Stougiannos PN, Zairis MN, Foussas SG, Pyrgakis VN, Kyriazis IA. 2009. Diabetic myocardial disease: pathophysiology, early diagnosis and therapeutic options. *J Diabetes Complications*, 23 (4):273-282.
- Nascimben L, Ingwall JS, Pauletto P, Friedrich J, Gwathmey JK, Saks V, Pessina AC, Allen PD. 1996. Creatine kinase system in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation*, 94 (8):1894-1901.
- Nemoto S, Sheng Z, Lin A. 1998. Opposing effects of Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinases on cardiomyocyte hypertrophy. *Mol Cell Biol*, 18 (6):3518-3526.
- Olefsky JM. 1976. Insulin's effect on glucose oxidation independent of glucose transport. *Biochem Biophys Res Commun*, 71 (1):106-113.
- Pagel-Langenickel I, Bao J, Joseph JJ, Schwartz DR, Mantell BS, Xu X, Raghavachari N, Sack MN. 2008. PGC-1alpha integrates insulin signaling, mitochondrial regulation, and bioenergetic function in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 283 (33):22464-22472.
- Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S, Miyazaki Y, Kohane I, Costello M, Saccone R, Landaker EJ, Goldfine AB, Mun E, DeFronzo R, Finlayson J, Kahn CR, Mandarino LJ. 2003. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (14):8466-8471.
- Peterson LR, Herrero P, Schechtman KB, Racette SB, Waggoner AD, Kisrieva-Ware Z, Dence C, Klein S, Marsala J, Meyer T, Gropler RJ. 2004. Effect of obesity and insulin resistance on myocardial substrate metabolism and efficiency in young women. *Circulation*, 109 (18):2191-2196.
- Pierce GN, Dhalla NS. 1985. Heart mitochondrial function in chronic experimental diabetes in rats. *Can J Cardiol*, 1 (1):48-54.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92 (6):829-839.
- Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang CY, Krauss S, Mootha VK, Lowell BB, Spiegelman BM. 2001. Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell*, 8 (5):971-982.
- Razeghi P, Young ME, Cockrill TC, Frazier OH, Taegtmeier H. 2002. Downregulation of myocardial myocyte enhancer factor 2C and myocyte enhancer factor 2C-regulated

- gene expression in diabetic patients with nonischemic heart failure. *Circulation*, 106 (4):407-411.
- Sabbah HN, Sharov V, Riddle JM, Kono T, Lesch M, Goldstein S. 1992. Mitochondrial abnormalities in myocardium of dogs with chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 24 (11):1333-1347.
- Saltiel AR, Kahn CR. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414 (6865):799-806.
- Scarpulla RC. 2008. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev*, 88 (2):611-638.
- Scheuermann-Freestone M, Madsen PL, Manners D, Blamire AM, Buckingham RE, Styles P, Radda GK, Neubauer S, Clarke K. 2003. Abnormal cardiac and skeletal muscle energy metabolism in patients with type 2 diabetes. *Circulation*, 107 (24):3040-3046.
- Schwarzer M, Schrepper A, Bugger H, Pytel G, Mohr FW, Doenst T. 2008. Abstract 5386: The Development of Heart Failure in Rats is Associated with Impaired Insulin Response and Mitochondrial Dysfunction. *Circulation*, 118 (18_MeetingAbstracts):S_540-.
- Sena S, Hu P, Zhang D, Wang X, Wayment B, Olsen C, Avelar E, Abel ED, Litwin SE. 2009. Impaired insulin signaling accelerates cardiac mitochondrial dysfunction after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 46 (6):910-918.
- Sharov VG, Goussev A, Lesch M, Goldstein S, Sabbah HN. 1998. Abnormal mitochondrial function in myocardium of dogs with chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 30 (9):1757-1762.
- Shen X, Zheng S, Thongboonkerd V, Xu M, Pierce WM, Jr., Klein JB, Epstein PN. 2004. Cardiac mitochondrial damage and biogenesis in a chronic model of type 1 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 287 (5):E896-905.
- Shindler DM, Kostis JB, Yusuf S, Quinones MA, Pitt B, Stewart D, Pinkett T, Ghali JK, Wilson AC. 1996. Diabetes mellitus, a predictor of morbidity and mortality in the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD) Trials and Registry. *Am J Cardiol*, 77 (11):1017-1020.
- Simoneau JA, Veerkamp JH, Turcotte LP, Kelley DE. 1999. Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss. *FASEB J*, 13 (14):2051-2060.

- Slot JW, Geuze HJ, Gigengack S, James DE, Lienhard GE. 1991. Translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac myocytes of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (17):7815-7819.
- Somwar R, Perreault M, Kapur S, Taha C, Sweeney G, Ramlal T, Kim DY, Keen J, Cote CH, Klip A, Marette A. 2000. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha and beta by insulin and contraction in rat skeletal muscle: potential role in the stimulation of glucose transport. *Diabetes*, 49 (11):1794-1800.
- Spindler M, Saupe KW, Tian R, Ahmed S, Matlib MA, Ingwall JS. 1999. Altered creatine kinase enzyme kinetics in diabetic cardiomyopathy. A(31)P NMR magnetization transfer study of the intact beating rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, 31 (12):2175-2189.
- St-Pierre J, Lin J, Krauss S, Tarr PT, Yang R, Newgard CB, Spiegelman BM. 2003. Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J Biol Chem*, 278 (29):26597-26603.
- Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. 2005. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*, 85 (3):1093-1129.
- Starling RC, Hammer DF, Altschuld RA. 1998. Human myocardial ATP content and in vivo contractile function. *Mol Cell Biochem*, 180 (1-2):171-177.
- Sutton MG, Sharpe N. 2000. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*, 101 (25):2981-2988.
- Swan JW, Anker SD, Walton C, Godsland IF, Clark AL, Leyva F, Stevenson JC, Coats AJ. 1997. Insulin resistance in chronic heart failure: relation to severity and etiology of heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 30 (2):527-532.
- Swynghedauw B. 1999. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev*, 79 (1):215-262.
- Taegtmeyer H. 2007. Fueling the Heart: Multiple Roles for Cardiac Metabolism. In: Willerson JT, Cohn JN, Wellens HJJ, Holmes DR, Hrsg. *Cardiovascular Medicine*, 3rd edition. London: Springer-Verlag (London), 1157-1175.
- Taylor CJ, Roalfe AK, Iles R, Hobbs FD. 2012. Ten-year prognosis of heart failure in the community: follow-up data from the Echocardiographic Heart of England Screening (ECHOES) study. *Eur J Heart Fail*, 14 (2):176-184.
- Thirone AC, Huang C, Klip A. 2006. Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. *Trends Endocrinol Metab*, 17 (2):72-78.

- Thorburn AW, Gumbiner B, Bulacan F, Wallace P, Henry RR. 1990. Intracellular glucose oxidation and glycogen synthase activity are reduced in non-insulin-dependent (type II) diabetes independent of impaired glucose uptake. *J Clin Invest*, 85 (2):522-529.
- Visscher MB, Muller EA. 1927. The influence of insulin upon the mammalian heart. *J Physiol*, 62 (4):341-348.
- Wall JA, Wei J, Ly M, Belmont P, Martindale JJ, Tran D, Sun J, Chen WJ, Yu W, Oeller P, Briggs S, Gustafsson AB, Sayen MR, Gottlieb RA, Glembotski CC. 2006. Alterations in oxidative phosphorylation complex proteins in the hearts of transgenic mice that overexpress the p38 MAP kinase activator, MAP kinase kinase 6. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291 (5):H2462-2472.
- Watson RT, Pessin JE. 2006. Bridging the GAP between insulin signaling and GLUT4 translocation. *Trends Biochem Sci*, 31 (4):215-222.
- White HD, Norris RM, Brown MA, Brandt PW, Whitlock RM, Wild CJ. 1987. Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation*, 76 (1):44-51.
- Wright DC, Han DH, Garcia-Roves PM, Geiger PC, Jones TE, Holloszy JO. 2007. Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1 α expression. *J Biol Chem*, 282 (1):194-199.
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM. 1999. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, 98 (1):115-124.
- Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM. 2001. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*, 413 (6852):131-138.
- Zarain-Herzberg A, Afzal N, Elimban V, Dhalla NS. 1996. Decreased expression of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-pump ATPase in congestive heart failure due to myocardial infarction. *Mol Cell Biochem*, 163-164:285-290.
- Zechner D, Thuerauf DJ, Hanford DS, McDonough PM, Glembotski CC. 1997. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in myocardial cell growth, sarcomeric organization, and cardiac-specific gene expression. *J Cell Biol*, 139 (1):115-127.
- Zhang L, Jaswal JS, Ussher JR, Sankaralingam S, Wagg C, Zaugg M, Lopaschuk GD. 2013. Cardiac insulin-resistance and decreased mitochondrial energy production precede the

development of systolic heart failure after pressure-overload hypertrophy. *Circ Heart Fail*, 6 (5):1039-1048.

Zorzano A, Sevilla L, Camps M, Becker C, Meyer J, Kammermeier H, Munoz P, Guma A, Testar X, Palacin M, Blasi J, Fischer Y. 1997. Regulation of glucose transport, and glucose transporters expression and trafficking in the heart: studies in cardiac myocytes. *Am J Cardiol*, 80 (3A):65A-76A.

8 ANHANG

8.1 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: *nicht zutreffend*,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

8.2 DANKSAGUNG

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen, die mir auf meinem bisherigen akademischen Weg mit Rat und Tat zur Seite standen und damit direkt oder indirekt zum Gelingen der Promotion beigetragen haben.

Herzlich danken möchte ich Univ. Prof. Dr. med. Torsten Doenst für die Begleitung dieser Arbeit und die kompetente Betreuung. In seinem Engagement in der Lehre und in der Forschung ist er für mich ein Vorbild.

Herrn Dr. rer. nat. Michael Schwarzer gilt mein besonderer Dank für die umfassende Unterstützung während der experimentellen Arbeiten.

Insbesondere möchte ich den Co-Autoren der Publikation danken. Sie haben mich mit ihrer Diskussionsbereitschaft und der praktischen Hilfe bei der Verwirklichung dieser Arbeit unterstützt.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern José Artur e Maria Tereza für die ständige Unterstützung und meiner Frau Manuela Tasca dafür dass sie immer für mich da ist.

8.3 LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name	de Araujo Amorim, Paulo Artur
Geburtsdatum	10. September 1983
Geburtsort	Rio de Janeiro, Brasilien
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	portugiesisch
E-Mail	paulo.amorim@med.uni-jena.de

Schul Ausbildung und Studium

1991 – 2000	Grundschule und Gymnasium in Rio de Janeiro Stadt
06/2001 – 06/2008	Medizinstudium an der Medizinischen Schule der Universität Gama Filho in Rio de Janeiro Stadt

Wissenschaftlicher Werdegang

04/2009 – 03/2010	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Klinik für Herzchirurgie, Herzzentrum Leipzig Betreuer: Prof. Dr. med. Torsten Doenst
04/2010 – 03/2011	Assistenzarzt und wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Klinik für Herzchirurgie, Herzzentrum Leipzig
04/2011 – 11/2012	Assistenzarzt in der Klinik für Herzchirurgie, Herzzentrum Leipzig
Seit 01/2013	Assistenzarzt in der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Jena

8.4 WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN

Originalarbeiten:

1. Tasca R, Tasca MG, **Amorim PA**, Nascimento IC, Veloso OC, Scherr C (2007) Clinical follow-up of a pregnant woman with cor triatriatum. *Arq Bras Cardiol.* Mar;88(3):e56-8.
2. Bugger H, Schwarzer M, Chen D, Schrepper A, **Amorim PA**, Schoepe M, Nguyen TD, Mohr FW, Khalimonchuk O, Weimer BC, Doenst T (2010) Proteomic remodelling of mitochondrial oxidative pathways in pressure overload-induced heart failure. *Cardiovasc Res* 85:376-384
3. Doenst T, Pytel G, Schrepper A, **Amorim P**, Färber G, Shingu Y, Mohr FW, Schwarzer M (2010) Decreased rates of substrate oxidation ex vivo predict the onset of heart failure and contractile dysfunction in rats with pressure overload. *Cardiovasc Res.* Jun 1;86(3):461-70.
4. Doenst T, **Amorim PA** (2010) Metabolic therapy in cardiac surgery--"Optimizing the engine's fuel supply and more...". *Scand Cardiovasc J.* Feb;44(1):4-8.
5. **Amorim PA***, Nguyen TD*, Shingu Y, Schwarzer M, Mohr FW, Schrepper A, Doenst T (2010) Myocardial infarction in rats causes partial impairment in insulin response associated with reduced fatty acid oxidation and mitochondrial gene expression. *J Thorac Cardiovasc Surg* 140:1160-1167 (*: *geteilte Erstautorenschaft*)
6. Shingu Y, **Amorim P**, Nguyen TD, Mohr FW, Schwarzer M, Doenst T (2010) Myocardial performance (Tei) index is normal in diastolic and systolic heart failure induced by pressure overload in rats. *Eur J Echocardiogr* 11:829-833
7. Doenst T, **Amorim PA**, Al-Alam N, Lehmann S, Mukherjee C, Faerber G (2011) Where is the common sense in aortic valve replacement? A review of hemodynamics and sizing of stented tissue valves. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Nov;142(5):1180-7.
8. Schrepper A, Schwarzer M, Schöpe M, **Amorim PA**, Doenst T (2012) Biphasic response of skeletal muscle mitochondria to chronic cardiac pressure overload - role of respiratory chain complex activity. *J Mol Cell Cardiol.* Jan;52(1):125-35.

9. **Amorim PA**, Penov K, Lehmkuhl L, Haensig M, Mohr FW, Rastan AJ (2013) Not all porcelain is the same: classification of circular aortic calcifications (porcelain aorta) according to the impact on therapeutic approach. *Thorac Cardiovasc Surg.* Oct;61(7):559-63.
10. Shingu Y, **Amorim PA**, Nguyen TD, Osterholt M, Schwarzer M, Doenst T (2013) Echocardiography alone allows the determination of heart failure stages in rats with pressure overload *Thorac Cardiovasc Surg.* Dec;61(8):718-25.
11. Schwarzer M, Schrepper A, **Amorim PA**, Osterholt M, Doenst T (2013) Pressure overload differentially affects respiratory capacity in interfibrillar and subsarcolemmal mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Feb 15;304(4):H529-37.
12. Nguyen TD, Shingu Y, **Amorim PA**, Schwarzer M, Doenst T (2013) Glucagon-like peptide-1 reduces contractile function and fails to boost myocardial glucose utilization in normal hearts in the presence of fatty acids. *Int J Cardiol.* Oct 9;168(4):4085-92
13. Schwarzer M*, Nguyen TD*, Schrepper A, Muehle A, **Amorim PA**, Hain C, Blum D, Doenst T (2013) A role for PTP1B in cardiac insulin resistance and mitochondrial dysfunction induced by pressure overload. (*: *geteilte Erstautorenschaft*). In Vorbereitung
14. Nguyen TD, Shingu Y, **Amorim PA**, Schwarzer M, Doenst T (2013) GLP-1 preserves diastolic function and cardiac glucose oxidation and improves survival in rats with pressure overload. In Vorbereitung
15. Doenst T, **Amorim PA**, Diab M, Hagendorff A, Faerber G, Graff J, Rastan A, Deutsch O, Eichinger W (2014) Novel Thoughts on Patient-Prosthesis-Mismatch in Aortic Valve Replacement – The Rationale for the PAR I Trial. *Thorac Cardiovasc Surg in Press*

Brief an den Herausgeber:

1. **Amorim PA**, Doenst T (2010). Alternative interpretation of mitochondrial metabolic changes in atrial tissue of type II diabetic human heart. *J Am Coll Cardiol.* Mar 23;55(12):1280-1

Vorträge:

1. **Amorim PA**, Nguyen TD, Schrepper A, Koeppen A, Schwarzer M, Shingu Y, Mohr FW, Doenst T. Cardiac Insulin Resistance as a Common Feature of Pressure Overload- and Myocardial Infarction-Induced Heart Failure. In: Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (DGTHG Stuttgart 2010)
2. **Amorim PA**, Nguyen TD, Schrepper A, Hein C, Shingu Y, Mohr FW, Doenst T. Cardiac Insulin Resistance as a Risk Factor for Heart Failure. In: American Association for Thoracic Surgery (AATS Toronto 2010)
3. **Amorim PA**, Shingu, Y, Nguyen TD, Schrepper A, Schwarzer M, Doenst T. Surgical Ventricular Reconstruction Improves Cardiac metabolic Efficiency after myocardial infarction in rats. In: 21st World Congress of the World Society of Cardio-Thoracic Surgeons (WSCTS Berlin 2011)